



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE SAÚDE COLETIVA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE COLETIVA
MESTRADO EM SAÚDE COLETIVA**

JOILDA SILVA NERY

**DISTRIBUIÇÃO DE CEPAS DE *Mycobacterium tuberculosis* NO
ESPAÇO URBANO DE SALVADOR: CONTRIBUIÇÕES À
EPIDEMIOLOGIA**

Salvador
2011

JOILDA SILVA NERY

**DISTRIBUIÇÃO DE CEPAS DE *Mycobacterium tuberculosis* NO
ESPAÇO URBANO DE SALVADOR: CONTRIBUIÇÕES À
EPIDEMIOLOGIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós -
graduação em Saúde Coletiva, Instituto de
Saúde Coletiva, Universidade Federal da
Bahia, como requisito parcial para obtenção do
título de mestre em Saúde Coletiva.

Área de concentração: Epidemiologia

Orientadora: Prof^a Dr^a Susan Martins Pereira

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Theolis Barbosa

Salvador
2011

Ficha Catalográfica
Elaboração Biblioteca do Instituto de Saúde Coletiva

N443d Nery, Joilda Silva.

Distribuição de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* no espaço urbano de Salvador: contribuições à epidemiologia / Joilda Silva Nery. -- Salvador: J. S. Nery, 2011.

71 f. + projeto de qualificação.

Orientadora: Profa. Dra. Susan Martins Pereira.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Saúde Coletiva.
Universidade Federal da Bahia.

1. Tuberculose. 2. *Mycobacterium tuberculosis* – genética. 3. Genotipagem. 4. Distrito Sanitário. I. Título.

CDU 616

JOILDA SILVA NERY

**DISTRIBUIÇÃO DE CEPAS DE *Mycobacterium tuberculosis* NO
ESPAÇO URBANO DE SALVADOR: CONTRIBUIÇÕES À
EPIDEMIOLOGIA**

Banca examinadora:

Prof^a Susan Martins Pereira - Orientadora
Instituto de Saúde Coletiva - Universidade Federal da Bahia (UFBA)

Prof^o Guilherme de Sousa Ribeiro
Instituto de Saúde Coletiva - Universidade Federal da Bahia (UFBA)

Prof^a Lucilaine Ferrazoli
Instituto Adolfo Lutz (IAL)

Prof^a Theolis Bessa Barbosa - Suplente
Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz – Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ/BA)

Salvador
2011

DEDICATÓRIA

*A meus pais e irmã pelo apoio incondicional pelo amor
e dedicação de toda vida.*

*A Fabio Roberto, companheiro e cúmplice,
com quem compartilho momentos de muita felicidade.*

*"Confia no Deus eterno de todo o seu coração e não se apoie na sua
própria inteligência. Lembre-se de Deus em tudo o que fizer, e ele lhe
mostrará o caminho certo." (Prov. 3:5-6)*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e por sua providência que sempre conduz meus passos pelos caminhos do bem.

A meus pais e irmã, João Carlos, Sinvalda e Aninha, por me fazerem compreender ao longo da minha existência o sentido da palavra família. Muitíssimo obrigada por tudo!

A Fabio Roberto, sogros e cunhados pelo apoio, estímulo e carinho concedido desde a minha chegada em Salvador.

Aos meus amigos pelo amor, paciência e compreensão nos momentos de ausência.

A Susan Martins Pereira pela oportunidade de realizar o mestrado sob sua orientação. Pela confiança e por ter o privilégio de trabalhar com esta excelente profissional e ser humano.

A minha co-orientadora, Theolis Bessa Barbosa, pela valiosa contribuição e exemplo de profissionalismo. Pelo inestimável apoio em todos os momentos.

Ao Dr. Sérgio Arruda por ter me acolhido em sua equipe e pelas oportunidades proporcionadas que culminaram com a realização deste trabalho.

A equipe do setor de Micobacteriologia do LACEN/BA pelos conhecimentos compartilhados e apoio incondicional.

Ao Prof^o Maurício Barreto por tornar as aulas um momento de contentamento e reflexão e pelas sugestões na construção desta dissertação.

Aos amigos da FIOCRUZ/BA, Jaque, Tonya, Evelin, Bete, Lukary, Márcia e Antonio Muniz pelo incentivo, parceria e ótima convivência.

A Glaucea Cabral pela amizade, confiança e sua constante disposição em me ajudar.

Aos colegas de turma, que guardarei em minhas recordações com muito carinho.

Aos professores Joice Reis e Guilherme Ribeiro pelas preciosas contribuições no Exame de Qualificação.

A Priscila Ramos e seus pais, pelo acolhimento em São Paulo e

amizade... que tanta saudade me traz!

A Lucilaine Ferrazoli, Vera Simosen e equipe do setor de Micobacteriologia do IAL por terem me recebido em seu laboratório e pelo aprendizado.

Ao Henri Berghs, pela sua atenção, disponibilidade e ensinamentos sobre o Bionumerics e análise dos dados de genotipagem.

A Dr^a Marta Oliveira pelo apoio e viabilização do spoligotyping.

Ao Instituto de Saúde Coletiva e seus professores com quem tive oportunidade de conviver que me passaram seus conhecimentos, cooperando de forma importante para meu aperfeiçoamento pessoal e profissional.

Aos funcionários do Instituto de Saúde Coletiva, que no desempenho de suas obrigações, contribuíram de alguma forma, tornando a rotina mais alegre e agradável.

Às enfermeiras Rosana, Maeli e Milena pela dedicação, no sentido mais amplo da palavra, sem o qual, não seria possível a realização deste trabalho.

A Rosane Santana e digitadores do “Projeto Redes” pelo auxílio nos bancos de dados.

A Márcio Natividade pela disponibilidade e dedicação na elaboração dos mapas.

Ao CNPq pelo financiamento do projeto de pesquisa e bolsa de estudos.

Aos meus alunos e colegas docentes pela calorosa torcida.

A todos aqueles que, de alguma forma, participaram na minha formação e auxiliaram na realização deste trabalho. Dedico com a mais profunda gratidão e respeito a vocês que compartilharam os meus ideais.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

Abreviatura	Significado
µg	Micrograma
µL	Microlitro
AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
BA	Bahia
BAAR	Bacilo álcool-ácido resistente
BCG	Bacilo de <i>Calmette Guérin</i>
BK	Bacilo de Koch
CONDER	Companhia de Desenvolvimento Urbano do Estado da Bahia
CPqGM	Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz
CRA	Coordenadoria de Regulação e Avaliação
CTAB	Brometo de cetil-trimetil-amônio
DATASUS	Dados epidemiológicos do Sistema Único de Saúde
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTPs	Desoxinucleosídeos trifosfatos
DR	<i>Direct repeat</i>
DS	Distrito sanitário
EAI	<i>East – African – Índia</i>
EDTA	Ácido etileno diaminotetracético
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GPS	<i>Global Positioning System</i>
H	Haarlem
HCl	Ácido clorídrico
HEOM	Hospital Especializado Octávio Mangabeira
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IBIT	Instituto Brasileiro para Investigação do Tórax
IC	Intervalo de confiança
IS	<i>Insertion Sequence</i> (Seqüência de inserção)
Kb	Kilobase
KCl	Cloreto de potássio
LACEN	Laboratório Central de Saúde Pública
LAM	Latino América – Mediterrâneo
LJ	<i>Löwenstein - Jensen</i>
M	Molar
mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de magnésio

Abreviatura	Significado
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MS	Ministério da Saúde
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
ng	Nanograma
OMS	Organização Mundial da Saúde
pb	Pares de base
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
PCT	Programa de Controle da Tuberculose
PGG	<i>Group Genetic Principal</i> (Grupo Genético Principal)
PNB	Ácido paranitrobenzóico
RD	Região de Deleção
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (Polimorfismo no tamanho dos fragmentos de restrição)
RP	Razão de prevalência
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SINAN	Sistema de Informações sobre Agravos de Notificação
SINANNET	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SIT	<i>Shared International Type</i>
SMS	Secretaria Municipal da Saúde
SUIS	Subcoordenação de Informações de Saúde
SUS	Sistema Único de Saúde
TB	Tuberculose
TCH	Hidrazida de ácido tiofeno
TE	Tris-EDTA
U	Unidade
UPGMA	<i>Unweighted pair group method with arithmetic averages</i> (Análise de agrupamentos pelo método de médias aritméticas não-ponderadas)

INDICE DE TABELAS

Tabela 1: Características da população de estudo. Salvador, Bahia, agosto de 2008 a dezembro de 2009.....49

Tabela 2: Número e frequência de casos de tuberculose pulmonar por distrito sanitário de residência. Salvador, Bahia, agosto de 2008 a dezembro 2009.....51

Tabela 3: Frequência dos casos em *cluster* e não *cluster* por distrito sanitário de residência. Salvador, Bahia, agosto de 2008 a dezembro de 2009.....52

Tabela 4: Razões de prevalência e respectivos intervalos de confiança para associação entre variáveis descritoras e *clusters*. Salvador, Bahia, agosto de 2008 a dezembro de 2009.....53

Tabela 5: Frequência das famílias de *M. tuberculosis*. Salvador, Bahia, agosto de 2008 a dezembro 2009.....54

Tabela 6: Frequência e proporção das famílias de *M. tuberculosis* por distrito sanitário de residência. Salvador, Bahia, agosto de 2008 e dezembro de 2009.....55

Tabela 7: Frequência das subfamílias de *M. tuberculosis*. Salvador, Bahia, agosto de 2008 a dezembro de 2009.....56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Proporção da população de estudo por Distrito Sanitário. Salvador, Bahia, agosto de 2008 a dezembro de 2009.....58

Figura 2: Padrão eletroforético dos isolados de *M.tuberculosis* com cinco ou menos cópias do *IS6110*.....59

Figura 3: Padrão eletroforético dos isolados de *M.tuberculosis* e nomenclatura dos *clusters*.....60

Figura 4: Proporção das famílias de *Mycobacterium tuberculosis* por Distrito Sanitário. Salvador, Bahia, agosto de 2008 a dezembro de 2009.....62

ANEXOS

ANEXO I.....67

Tabela 1: Frequência e proporção das ocupações exercidas pelos casos com TB pulmonar. Salvador, Bahia, agosto de 2008 a dezembro de 2009.....68

Tabela 2: Número e frequência de casos por bairros de residência. Salvador, Bahia, agosto de 2008 a dezembro de 2009.....70

Tabela 3: Número de isolados de *M. tuberculosis* classificados de acordo com os padrões obtidos por spoligotyping e nomenclatura das subfamílias na base SpolDB4. Salvador, Bahia, agosto de 2008 a dezembro de 2009.....72

Tabela 4: Número e padrões binários de isolados de *M. tuberculosis* não encontrados no SpolDB4. Salvador, Bahia, agosto de 2008 a dezembro de 2009.....74

Tabela 5: Diversidade de padrões por RFLP obtidos nas subfamílias de *M. tuberculosis*. Salvador, Bahia, agosto de 2008 a dezembro de 2009.....76

Quadro 1: Frequência e proporção de casos novos de tuberculose notificados por unidades de captação e que foram incluídos do estudo, com respectivos distritos sanitários. Salvador, Bahia, 2005.....78

Quadro 2: Características dos casos pertencentes aos *clusters*. Salvador, Bahia, agosto de 2008 a dezembro de 2009.....79

ANEXO II

Ficha de Notificação do SINAN.....85

ANEXO III

Projeto de Pesquisa.....86

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA

AGRADECIMENTOS

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

ÍNDICE DE TABELAS

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE ANEXOS

ARTIGO

RESUMO.....15

ABSTRACT.....16

1. INTRODUÇÃO.....17

2. METODOLOGIA.....20

2.1 Desenho.....20

2.2 População e local do estudo20

2.3 Coleta de dados e amostras clínicas.....21

2.4 Isolamento e identificação de *Mycobacterium tuberculosis*.....22

2.5 RFLP- *IS6110*.....23

2.6 Spoligotyping.....23

2.7 Análise de *clusters* e famílias genéticas.....24

2.8 Análise estatística.....25

2.9 Descrição da distribuição espacial das famílias.....25

2.10 Considerações éticas.....26

3. RESULTADOS.....27

3.1 Características da população de estudo.....27

3.2 Descrição dos casos em *cluster*.....28

3.3 Descrição e distribuição espacial das famílias genotípicas de *M. tuberculosis*.....31

4. DISCUSSÃO.....33

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....41

REFERÊNCIAS.....42

TABELAS.....	48
FIGURAS.....	57
ANEXOS.....	67
ANEXO I.....	67
ANEXO II.....	85
ANEXO III	86

DISTRIBUIÇÃO DE CEPAS DE *Mycobacterium tuberculosis* NO ESPAÇO URBANO DE SALVADOR: CONTRIBUIÇÕES À EPIDEMIOLOGIA

RESUMO

A utilização de técnicas para genotipagem de *Mycobacterium tuberculosis* possibilita um melhor entendimento da dinâmica de transmissão da tuberculose. Entretanto, há carência de investigações com esta abordagem no município de Salvador (BA), a fim de elucidar aspectos relacionados à ocorrência e manutenção da doença. Foi realizado um estudo transversal de base populacional para caracterizar e descrever a distribuição espacial de cepas de *M. tuberculosis* isoladas de casos bacilíferos residentes no município entre agosto de 2008 e dezembro de 2009. A captação dos dados sócio-demográficos foi realizada com a aplicação de questionário e amostras clínicas foram coletadas para isolamento do *M. tuberculosis* e genotipagem por RFLP *IS6110* e *spoligotyping*. Um total de 326 casos foi analisado e 70 isolados (23,3%) formaram 27 *clusters*, enquanto 230 (76,7%) apresentaram perfis únicos. Alguns casos em *cluster* apresentaram diagnósticos realizados em meses subseqüentes e muitos *clusters* foram compostos por residentes em bairros limítrofes ou próximos e nos mesmos distritos sanitários. O 9° DS Cabula/Beiru apresentou a maior proporção de casos em *cluster* (34%), com associação estatisticamente significativa em residir neste DS e *cluster* (RP = 1,61; IC 95%: 1,03 – 2,52). Sete famílias de *M. tuberculosis* foram identificadas: LAM (50,6%), Haarlem (10,7%), T (8,6%), X (7,4%), U (4,6%), S (0,3%) e EAI (0,3%), 57 (17,5%) isolados não puderam ser classificadas em famílias utilizando a base de dados SpolDB4. Observou-se um padrão diversificado na distribuição dos perfis genéticos de *M. tuberculosis* nos DS de Salvador, com maior concentração de casos nos bairros periféricos da cidade. Os dados apresentam um panorama preliminar sendo de interesse para a compreensão da epidemiologia da tuberculose. Concluímos que em Salvador há predomínio de uma população geneticamente diversificada de *M. tuberculosis* com circulação diferencial dos perfis e famílias genéticas nos diferentes espaços, indicando transmissão ativa de determinados perfis em áreas específicas. Sugere-se a realização de análise espacial mais refinada, com a integração de metodologias e dados de genotipagem e georeferenciamento.

Palavras - chave: Tuberculose, Genotipagem, Distribuição espacial

ABSTRACT

The use of techniques for genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* provides a better understanding of the dynamics of tuberculosis transmission. However, there are few studies using this approach in Salvador (BA) in order to elucidate aspects of the occurrence and maintenance of tuberculosis. We have conducted a cross-sectional study to characterize and describe the spatial distribution of *M. tuberculosis* strains circulating in the city between August 2008 and December 2009. Data collection was performed using a questionnaire. Bacteria were isolated from and genotyped by *IS6110* RFLP and spoligotyping. Overall 326 cases were analysed and 70 (23.3%) formed 27 *clusters* while 230 (76.7%) isolates had unique profiles. Some of these clustered cases were genetically identical to cases diagnosed in subsequent months, and many *clusters* were formed by individuals residing either in contiguous neighborhoods or in the same healthcare district. The healthcare district Cabula/Beiru had a higher proportion of clustered cases (34%), and a statistically significant association was found between residence in this healthcare district and belonging to a *cluster* (PR = 1.61, 95% CI: 1.03 - 2.52). Seven families *M. tuberculosis* strains belonged to: LAM (50.6%), Haarlem (10.7%), T (8.6%), X (7.4%), U (4.6%), S (0.3%) and EAI (0.3%). 57 (17.5%) isolates could not be classified according with the database SpolDB4. The genetic profiles of *M. tuberculosis* varied in their distribution among the different healthcare districts, with the highest concentration of cases in the suburbs of the city. The data present a preliminary overview is of interest for understanding the epidemiology of tuberculosis. We conclude that in Salvador there is a predominance of a genetically diverse population of *M. tuberculosis* and there is a differential movement between the genetic profiles and families in different places, indicating active transmission of certain profiles in specific areas. More refined spatial analysis studies should be performed, integrating data with genotyping and georeferencing methods.

Key – words: Tuberculosis, Genotyping, Spatial Distribution

1. INTRODUÇÃO

A tuberculose é uma doença de distribuição mundial sendo estimados em 2009 a ocorrência de 9,4 milhões de casos incidentes (137/100.000 habitantes). A prevalência mundial no mesmo ano foi de 14 milhões de casos, o equivalente a 200 casos/100.000 habitantes e 1,3 milhões de óbitos ocasionados pela doença (WHO, 2010).

No Brasil, a incidência de TB permaneceu estável nos últimos anos, sendo que em 2009, a incidência de tuberculose pulmonar bacilífera foi 29,3/100.000 habitantes (MS, 2009). Devido às desigualdades socioeconômicas existentes, observa-se uma variação das taxas em diferentes regiões (MS, 2009). Entretanto, a doença apresenta as mais altas incidências nas capitais, devido à alta densidade demográfica, aos bolsões de pobreza e ao elevado risco de infecção (Xavier & Barreto, 2007).

No estado da Bahia foram notificados 4.694 casos novos de tuberculose pulmonar em 2009, com uma incidência 32,06/100.000 habitantes no mesmo ano (SMS/ SINANNET, 2010). O município de Salvador notificou 1.653 casos novos de TB pulmonar em 2009 correspondendo à taxa de incidência de 55,1/100.000 habitantes (SMS/ SINANNET, 2010).

A tuberculose pulmonar é diagnosticada com a detecção do *Mycobacterium tuberculosis* em espécimes do trato respiratório pela baciloscopia ou isolamento do microrganismo em cultura. Apesar das medidas de prevenção conhecidas, tais como a vacinação com BCG, a tuberculose apresenta elevada magnitude. É uma doença curável em mais de 95% dos casos novos, com a realização do tratamento adequado (Telenti & Iseman, 2000). O diagnóstico precoce e tratamento correto são as principais estratégias para o controle da doença, pois interrompem a cadeia de transmissão, que são os pacientes bacilíferos.

A incorporação de métodos de genotipagem em investigações epidemiológicas permitiu avançar na produção de conhecimento a respeito da transmissão do *M. tuberculosis* e sua permanência em populações urbanas. Além disto, tem aumentado a compreensão a respeito da epidemiologia da tuberculose introduzindo novos conceitos para o entendimento da dinâmica de expansão do *M. tuberculosis* em uma dada população (Brudey *et al*, 2006).

Dados genotípicos também podem ser utilizados para fazer inferências sobre padrões de transmissão a nível populacional. Por exemplo, a ocorrência de grandes *clusters*, ou seja, isolados com genótipos idênticos em uma amostra, é indicativo de transmissão recente da tuberculose (Small *et al*, 1994; Alland *et al*, 1994) e agregação espacial de determinados genótipos de *M. tuberculosis* circulantes podem refletir transmissão local da doença (Haarse *et al*, 2007).

Entretanto estudos mais recentes apontam que esta dedução deve ser avaliada com atenção, visto que isto é aplicável em países com baixa prevalência de TB ou regiões rurais. Além disto, existem outros fatores, tais como a amostragem utilizada e as características da população que interferem na incidência de transmissão recente. O emprego de mais de uma técnica de genotipagem pode conferir maior confiabilidade nas proporções de transmissão recente em determinado local (Murray, 2002; Murray & Alland, 2002; Glynn *et al*, 2004).

Em áreas urbanas, a análise de *cluster* é útil para complementar a investigação epidemiológica, pois, além de possibilitar a identificação de locais de transmissão, verifica semelhanças e ligações entre os casos, bem como auxilia no monitoramento de surtos no decorrer do tempo (Vries *et al*, 2009).

A nível filogenético a distribuição de clones específicos de *M. tuberculosis* pode ser facilmente por métodos de tipagem molecular. Sendo assim, a caracterização de linhagens prevalentes, pode ser focada em diferentes níveis geográficos como continentes, países, regiões ou cidades para identificar a origem, evolução e dinâmica de expansão de clones particulares de *M. tuberculosis* (Durmaz *et al*, 2007).

Não há estudos que abordem a epidemiologia molecular da tuberculose e a caracterização das cepas circulantes em potencial transmissão no nordeste do Brasil. Além disto, Salvador, capital do Estado da Bahia, é considerada prioritária no controle da tuberculose, visto que as taxas médias de incidência e da mortalidade pela doença no município são elevadas (Xavier & Barreto, 2007).

Deste modo, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar as cepas de *M. tuberculosis* obtidas a partir de casos com tuberculose pulmonar bacilífera,

bem como apresentar a distribuição espacial dos padrões moleculares e famílias dos isolados em Salvador entre agosto de 2008 e dezembro de 2009.

2. METODOLOGIA

2.1 Desenho

Estudo transversal para analisar dados epidemiológicos e características genotípicas de *M. tuberculosis* provenientes de pacientes com tuberculose pulmonar bacilífera de Salvador, Bahia, diagnosticados entre agosto de 2008 e dezembro de 2009.

2.2 População e local do estudo

A população do estudo consistiu em indivíduos atendidos nas Unidades Básicas de Saúde e Serviços de Referência para a doença diagnosticados com tuberculose pulmonar, apresentando baciloscopia e cultura positivas para *M. tuberculosis*, sem tratamento prévio, a partir de 15 anos de idade, residentes em Salvador no período de agosto de 2008 a dezembro 2009.

Neste estudo, optou-se trabalhar com os casos novos de tuberculose e foi utilizada a definição do Programa de Controle da Tuberculose (PCT), onde o caso novo seria o “indivíduo doente que nunca se submeteu a tratamento ou que o fez por um período menor que 30 dias ou há mais de cinco anos” (MS, 2005).

O município de Salvador, capital do estado da Bahia (latitude -12° 58' 23"; longitude -38° 30' 16") ocupa uma extensão territorial de 707 km². A população estimada para o ano de 2008 foi de 2.948.733 habitantes (IBGE, 2009). A sua organização político-administrativa compreende 18 Regiões Administrativas e 12 Distritos Sanitários (DS), os quais sediam 257 Unidades de Saúde. Destas, existem 38 unidades de atenção aos pacientes com tuberculose em todo o município e duas unidades de referência para o atendimento dos casos com TB.

Inicialmente, foi listado o número de casos de TB em cada DS e identificaram-se as unidades de saúde que notificaram maior número de casos em cada distrito, as quais foram incluídas no estudo (quadro 1). Os dados de

2005 foram utilizados por estarem disponíveis e completos no período de planejamento das ações do presente trabalho.

Quadro 1: Freqüência e proporção de casos de tuberculose notificados em 2005 nas unidades selecionadas para o estudo, com respectivos distritos sanitários

UNIDADE DE SAÚDE	DISTRITO SANITÁRIO	CASOS NOTIFICADOS (n / %)
HEOM	4º DS Liberdade	1364 / 38,9
IBIT	6º DS Barra/Rio Vermelho	374 / 10,6
2º Centro Ramiro de Azevedo	1º DS Centro Histórico	358 / 10,2
6º Centro Rodrigo Argolo	9º DS Cabula/Beiru	158 / 4,5
Adroaldo Albergaria	11º DS Subúrbio Ferroviário	100 / 2,8
3º Centro Profº Bezerra Lopes	4º DS Liberdade	147 / 4,2
Hospital Santo Antônio	2º DS Itapagipe	124 / 3,5
13º Centro Eduardo Mamede	8º DS Itapuã	47 / 1,3
TOTAL		2672 / 76

Fonte: SMS/CRA/SINAN

2.3 Coleta de dados e amostras clínicas

Um questionário padronizado foi aplicado para obtenção de informações sócio - demográficas dos casos, além de questões relacionadas a clínica e epidemiologia da tuberculose.

Os casos com ausência de informações no questionário tiveram dados obtidos a partir do Sistema de Informações sobre Agravos de Notificação do Ministério de Saúde (SINAN/MS).

As unidades de saúde participantes foram informadas oficialmente sobre o início da coleta e foram formadas equipes de campo, compostas por técnicos de enfermagem previamente treinados. Os entrevistadores foram orientados para a correta e padronizada aplicação dos questionários, de forma a garantir a fidedignidade e precisão dos dados coletados. Além disto, todas as unidades de saúde foram supervisionadas por três enfermeiras e relatórios mensais foram elaborados para acompanhamento.

Os entrevistadores compareceram às unidades de segunda a sexta, requisitando pacientes com suspeita de TB pulmonar e baciloscopia positiva confirmada na unidade de saúde, após coloração pelo método de *Ziehl – Neelsen* (MS, 2005) a participarem da pesquisa através da entrevista e coleta da amostra clínica. As entrevistas foram iniciadas somente após a apresentação dos objetivos do estudo, do caráter sigiloso das informações e leitura do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo III).

Após a coleta, todos os questionários foram revisados e a ausência de dados ou possíveis inconsistências foram retornadas ao entrevistador para complementação da informação através do prontuário médico ou do próprio entrevistado. Cada questionário recebeu um código, composto de seis dígitos.

As amostras de escarro foram obtidas por expectoração e as de lavado broncoalveolar foram coletadas sob orientação de equipe médica especializada, com auxílio do broncofibroscópio. O material foi coletado em recipiente estéril devidamente identificado com o nome do paciente e data da coleta seguindo as recomendações do PCT (MS, 2005).

Em seguida, as amostras foram devidamente acondicionadas em caixas térmicas refrigeradas e encaminhadas ao Laboratório Central de Saúde Pública Professor Gonçalo Moniz (LACEN/BA) em uma rotina previamente definida, para a realização do isolamento primário e identificação de *M. tuberculosis*.

2.4 Isolamento e identificação de *Mycobacterium tuberculosis*

As amostras foram descontaminadas pelo método *Petroff* e inoculadas em meio *Lowenstein Jensen* (LJ). Incubou-se em estufa a 37°C por até oito semanas, acompanhando semanalmente o crescimento das culturas. Todos os isolados foram submetidos aos testes para identificação de *M. tuberculosis*:

produção de niacina, redução do nitrato, inibição do crescimento em presença de ácido para-nitrobenzóico 500 µg/mL e resistência à hidrazida do ácido tio-feno-2-carboxílico 5 µg/mL (MS, 2005).

Os isolados foram congelados em 2 mL de meio *Sauton* enriquecido com 20% de glicerol a - 70 °C no Laboratório Nível de Biossegurança 3 do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz / FIOCRUZ para posterior extração do DNA bacteriano e genotipagem. As alíquotas de *M. tuberculosis* foram descongeladas e repicadas em meio LJ. Incubou-se em estufa a 37°C por até oito semanas e as culturas com crescimento satisfatório de colônias foram selecionadas para a extração do ácido desoxirribonucléico (DNA).

2.5 RFLP- IS6110

Para a confirmação da existência de similaridade entre as cepas de *M. tuberculosis* foi utilizada a técnica de investigação do polimorfismo dos fragmentos de restrição da seqüência IS6110 (RFLP) no Laboratório de Biologia Molecular/Setor de Micobactérias do Instituto Adolfo Lutz (IAL), de acordo com as recomendações propostas por van Embden *et al* (1993).

A técnica incluiu a extração do DNA cromossomal, digestão com a enzima *PvuII*, eletroforese do DNA genômico digerido e hibridização por *Southern blotting*, utilizando como sonda uma seqüência de 245 pares de base (pb) contida no IS6110.

O número de cópias da IS6110 foi determinado de acordo com o número de fragmentos de DNA hibridados com a respectiva sonda e visualizados em forma de banda compacta na membrana de náilon. Para cada banda visualizada, considerou-se uma cópia da IS6110.

A variabilidade na inserção e número de cópias de IS6110 foi detectada pela análise do perfil eletroforético obtido para cada um dos isolados, por comparação com a cepa de referência *M. tuberculosis* 14323 do banco de cepas do IAL.

2.6 Spoligotyping

O spoligotyping foi realizada de acordo com recomendações de Cowan *et al*

(2004), empregando o sistema Luminex.

Para cada um dos isolados, foi amplificada a região direct repeat (DR) por reação em cadeia da polimerase (PCR). Microsféricas conjugadas a oligonucleotídeos para reconhecimento de 43 diferentes espaçadores foram hibridizadas com este produto de PCR. A hibridização foi detectada pela captação simultânea de sinal fluorescente proveniente da microsférica (que identifica o espaçador conjugado) e do sinal fluorescente emitido por um fluorocromo repórter ligado ao produto de PCR hibridizado, utilizando um fluorímetro.

Foram utilizados como controles positivos as cepas *M. tuberculosis* H37Rv e *M. bovis* e água destilada como controle negativo.

2.7 Análise de *clusters* e famílias genéticas

Os perfis genéticos foram comparados com base no peso molecular e no número de cópias de fragmentos hibridados com a sonda *IS6110* pelo método *Unweighted pair group method with arithmetic averages* (UPGMA) e coeficiente de *Dice* para o pareamento (Dice, 1945), com uma tolerância de posição de 1,5% e a otimização de 1,0%.

Dois ou mais isolados foram agrupados em *clusters* quando seus padrões de RFLP *IS6110* foram indistinguíveis, isto é, apresentaram bandas idênticas em número e peso molecular. Os isolados com perfis genéticos únicos foram considerados como não pertencentes ao grupo genético (*não cluster*). Cepas que apresentaram cinco ou menos cópias da seqüência de inserção *IS6110* não foram incluídas na análise de *clusters* pelo RFLP *IS6110*.

O perfil genético de cada cepa de *M. tuberculosis* foi analisado visualmente e com o auxílio do programa de computação *Bionumerics* versão 6.1 (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica).

Os padrões obtidos no spoligotyping foram representados em formato binário no programa Excel (Microsoft Corporation, Washington) e comparados com os padrões da base de dados SITVIT4 (<http://www.pasteur-guadeloupe.fr:0881/SITVITDemo/>) para identificar os *Shared International Types* (SITs) e as famílias foram identificadas de acordo com o SpolDB4 (Brudey *et al*, 2006).

2.8 Análise estatística

Após a digitação dos questionários, foi realizada análise de consistência do banco de dados com correção de dados perdidos e informações repetidas. As variáveis contínuas foram categorizadas para posterior análise descritiva.

As variáveis selecionadas a partir do questionário clínico/sócio-demográfico foram: data da coleta/diagnóstico, naturalidade, bairro de residência, distrito sanitário (DS) de residência, idade, sexo, escolaridade, ocupação, tabagismo, consumo de álcool, uso de drogas ilícitas, raça/cor (auto-referida), situação do domicílio, padrão radiológico, história de contato, sorologia para HIV, resultado da baciloscopia, cicatriz vacinal, ocupação e residência do caso ou membro da família em prisão/rua/albergue.

As características clínicas e sócio-demográficas foram utilizadas como descritoras da população do estudo e dos casos agrupados em *cluster* pelo RFLP IS6110.

Calculou-se a frequência dos isolados em *cluster* e distintas famílias de *M. tuberculosis* no período do estudo. Na análise bivariada, para a comparação das prevalências de *clusters* segundo as características da população estudada foi utilizado o teste Qui-quadrado de Pearson.

A magnitude da associação entre os fatores de exposição e a ocorrência de *cluster* foi obtida pela estimativa da razão de prevalência e respectivos intervalos de confiança de 95% (IC 95%).

Empregou-se o software STATA versão 10.0 na análise estatística.

2.9 Descrição da distribuição espacial das famílias

Os casos de tuberculose foram geocodificados a partir do endereço residencial, obtendo-se as coordenadas (latitude-longitude) em graus decimais com o auxílio do *Google Earth* versão 5.1, programa livre, disponível na Internet (<http://earth.google.com/intl/pt/>). Em estudo anterior, este programa foi submetido à análise de concordância através do método “*concordance correlation coefficient*” utilizando como padrão ouro as medições obtidas pelo

GPS, obtendo-se uma concordância de 94% em relação à latitude e 91% em relação à longitude (Uthman, 2008; Erazo, 2009).

Para análise, os dados foram agrupados considerando-se como unidade espacial os Distritos Sanitários. A análise descritiva foi realizada através da elaboração de mapas temáticos com a frequência das distintas famílias de *M. tuberculosis* por DS para identificar os padrões de distribuição no município.

Para geocodificação dos casos de tuberculose em Salvador foram utilizadas as malhas geográficas da base de dados cartográfica disponibilizadas pelo IBGE e CONDER. Para construção dos mapas temáticos foi utilizado o programa ArcView Gis 3.3.

2.10 Considerações éticas

O presente trabalho é parte integrante do projeto intitulado “Estudo da distribuição espacial e padrões de transmissão da tuberculose em Salvador através de técnicas moleculares e de análises de redes complexas”, e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Saúde Coletiva/Universidade Federal da Bahia (n° 012/07).

Os pacientes foram informados sobre os objetivos do estudo e assegurados da possibilidade de recusa. Antes da coleta dos dados, foi solicitada a autorização prévia para a realização da pesquisa, através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (Resoluções 196/96 e 304/2000) do Ministério da Saúde.

3. RESULTADOS

3.1 Características da população do estudo

A tabela 1 apresenta a caracterização da população do estudo, composta por 326 casos com tuberculose pulmonar bacilífera residentes em Salvador, Bahia, em relação às variáveis descritoras. A amostra obtida corresponde a 14 % dos casos de TB pulmonar bacilífera notificados entre agosto de 2008 e dezembro de 2009.

A idade variou entre 15 e 90 anos, sendo que a média foi de 36,6 e desvio padrão 14,2. A faixa etária que concentrou maior proporção de casos foi entre 20 e 34 anos. A maioria dos casos foi do sexo masculino (58,3%), de raça/cor parda (61,8%), com ensino fundamental incompleto ou completo (40,1%) e 79% residentes em domicílio próprio

Observou-se que 51 casos (18,6%) se encontram desempregados e 19 (6,9%) aposentados. Para os que estão empregados, as atividades mais freqüentes foram: autônomo (22/8%), estudante (19/ 6,9%), pedreiro (18/ 6,6%) e vendedor (13/ 4,7%) (Anexo I - Tabela 1).

A permanência do caso ou membro da sua família na rua, prisões ou abrigos foi informada por 34 pacientes (11,5%). Analisando-se o local de nascimento, 210 (68,9%) são provindos de Salvador, 84 (27,5%) de outros municípios da Bahia, enquanto 11 (3,6%) nasceram em outros estados do Brasil.

A maioria dos casos mencionou ser não fumante (83,3%), não consumidor de bebida alcoólica (63%) e drogas ilícitas (94,7%). Além disto, 24,6% dos casos afirmaram ter tido contato prévio com portador de tuberculose pulmonar e em 81,6% o padrão radiológico foi considerado suspeito para a doença. Cicatriz proveniente da vacinação com BCG foi identificada em 232 pacientes (76,1%). Entre os 86 (26,3%) casos testados para infecção pelo vírus HIV, 3 (3,5%) apresentam resultado positivo.

Na figura 1, está representado o mapa do município de Salvador demarcado por DS, com a distribuição das proporções de casos entrevistados e com cepas de *M. tuberculosis* analisadas no presente estudo.

O 11° DS Subúrbio Ferroviário, que aloca os bairros de Plataforma, Periperi, Paripe, entre outros, foi responsável por 20,9% dos casos captados. Em seguida os 9° DS Cabula/Beiru e 3° DS São Caetano/Valéria contribuíram com 59 (18,1%) e 58 (17,8%) casos respectivamente. Seguiram-se os DS de Liberdade (9,2%), Itapagipe (7,1%) e Barra/Rio Vermelho (6,7%) (Tabela 2).

Apesar da ampla distribuição dos casos nos diferentes bairros do município, a maioria é residente em Plataforma (5,8%), São Caetano (5,4%), Paripe (4,3%), Fazenda Grande (3,7%), Periperi (3,4%), Liberdade (3,1%) e Sussuarana (3,1%) (Anexo I - Tabela 2).

3.2 Descrição dos casos em *cluster*

No presente estudo, as culturas dos 326 casos foram positivas para *Mycobacterium tuberculosis* e genotipadas pelo RFLP *IS6110* e *spoligotyping*, na proporção de um isolado por caso.

Foram identificados 265 padrões distintos por RFLP *IS6110*, sendo que 230 (76,7%) isolados apresentaram perfis únicos (não *cluster*) e 70 (23,3%) foram agrupados em 27 *clusters* com dois a seis casos cada. Além disto, o número máximo do fragmento *IS6110* nos perfis identificados foi dezenove e 26 isolados (8%) possuíam cinco ou menos cópias do *IS6110*, o que os torna não interpretáveis por esta técnica (figura 2). A maioria dos *clusters* foi formada por dois casos e os maiores *clusters*, denominados BA1 e BA2, possuem seis e cinco casos respectivamente (Anexo I - Quadro 2).

A tabela 3 apresenta as proporções dos casos em *cluster* e não *cluster* por distritos sanitários. Nota-se que os DS que concentram as maiores freqüências de casos não são necessariamente os mesmos que possuem as maiores proporções de casos em *clusters*. Embora existam *clusters* em todos os DS, destacamos aqueles com maiores números de casos: o 9° DS Cabula/Beiru apresentou 34% dos seus casos distribuídos em diferentes *clusters*, enquanto o 11° DS Subúrbio Ferroviário e o 3° DS São Caetano/Valéria tiveram menores proporções de *cluster* (28,7% e 20,7% respectivamente). O 1° DS Centro Histórico e o 7° DS Boca do Rio, ambos com seis casos, possuíam dois destes (33,3%) agrupados em *cluster*.

Além disto, houve associação estatisticamente significativa residir do 9° DS Cabula/Beiru e pertencer a *cluster* (RP = 1,61; IC 95%: 1,03 – 2,52). Não houve associação estatisticamente significativa entre a ocorrência de *clusters* e as demais variáveis (Tabela 4).

Mediante uma análise descritiva dos indivíduos que compuseram os vinte e sete *clusters* por RFLP IS6110 observou-se que do total, em quinze *clusters* (55,5%) pelo menos um caso nasceu em outros municípios do Estado da Bahia. Quatro *clusters* (BA7, BA10, BA16 e BA20) foram formados exclusivamente por mulheres, sendo que nos demais, pelo menos um caso foi do sexo masculino (Anexo I - Quadro 2). O intervalo nas faixas etárias entre os indivíduos que compuseram os diferentes *clusters* foi amplo, entretanto predominaram *clusters* (19/ 70,3%) com pelo menos um indivíduo com idade superior a 40 anos.

A maior parte dos casos em *cluster* foi analfabeta ou com grau de escolaridade máxima no nível médio e para os que estavam inseridos no mercado de trabalho, as ocupações exercidas comumente não proporcionam um alto nível salarial. Em treze *clusters* (48,1%), pelo menos um caso afirmou ter tido história de contato na residência ou extradomiciliar com paciente com tuberculose e em 24 *clusters* (88,8%) pelo menos um caso apresentou duas ou três cruzes na baciloscopia.

No *cluster* BA1, composto por três homens e três mulheres, de raça/cor branca, parda e negra e que residiam em bairros localizados em diferentes regiões de Salvador, observou-se uma seqüência temporal no diagnóstico realizado entre os meses de fevereiro e outubro de 2009. Nos dois casos do *cluster* BA9, os casos foram diagnosticados em abril e maio do mesmo ano, sendo que, um dos casos não tinha cicatriz vacinal pela BCG, era usuário de drogas ilícitas, teve contato com paciente com tuberculose no mesmo domicílio e residiu na prisão.

Verificou-se semelhante seqüência temporal dos perfis nos *clusters* BA23, com os dois casos diagnosticados em outubro de 2008 e no BA27, onde os casos foram diagnosticados em agosto de 2009. No entanto, os *clusters* BA3 e BA4 apresentaram casos com cepas de *M. tuberculosis* que compartilharam o mesmo padrão genético e foram diagnosticados em diferentes períodos dos anos de 2008 e 2009.

Dos cinco casos que formaram o *cluster* BA2, três deles residiam no 9° DS Cabula/Beiru, nos bairros de São Gonçalo e Engomadeira, e dois casos no 11° DS do Subúrbio Ferroviário (Periperi e Lobato). Destaca-se que três destes indivíduos afirmaram ter contato prévio com paciente com tuberculose e um foi morador de rua. No *cluster* BA5, um dos indivíduos afirmou ser usuário de drogas ilícitas e teve contato com paciente com tuberculose no mesmo dormitório a mais de um ano antes do diagnóstico. Já o *cluster* BA6 incluiu um caso residente no Pelourinho, DS Centro Histórico, que morou na rua e teve contato prévio extradomiciliar com paciente com tuberculose.

O *cluster* BA7 foi formado pelo agrupamento dos perfis de três mulheres que residiam nos bairros de Fazenda Grande e São Caetano; duas localidades contíguas no município de Salvador pertencentes ao 3° DS São Caetano/Valéria. Duas delas, afirmaram ter contato prévio com vizinhos que apresentaram tuberculose a menos de um ano da coleta dos dados. O *cluster* BA8 foi composto por dois homens brancos, que apresentaram doença ativa com um intervalo de um ano entre eles e residentes nos bairros de Boa Viagem e Uruguai, ambos localizados no 2° DS Itapagipe.

Os casos do *cluster* BA12 moravam no 9° DS do Cabula/Beiru e os dos *clusters* BA13 e BA15 em bairros limítrofes do 2° DS Itapagipe. O *cluster* BA17 foi composto por dois indivíduos pardos, ambos moradores do bairro Uruguai (2° DS Itapagipe) sendo que um deles residiu em prisão e outro com história de contato com paciente com tuberculose no mesmo domicílio a menos de um ano.

No *cluster* BA21 os dois casos foram diagnosticados no mês de agosto de 2009 e residiam em bairros próximos (Itacaranha e Periperi), ambos localizados no 11° DS Subúrbio Ferroviário. Os dois casos do *cluster* BA22 também moravam no mesmo DS e ambos apresentaram três cruces na baciloscopia.

3.3 Descrição e distribuição espacial das famílias genóticas de *M. tuberculosis*

De acordo com os resultados do *spoligotyping*, obteve-se um total de 107 padrões distintos de *M. tuberculosis* com 257 isolados (78,8%) agrupados e 69 (21,2%) apresentaram perfis binários únicos. Sete famílias circulantes em Salvador no período do estudo foram identificadas: LAM (50,6%), Haarlem (10,7%), T (8,6%), X (7,4%), U (4,6%), S (0,3%) e EAI (0,3%). Entretanto, 57 (17,5%) isolados apresentam padrões órfãos, ou seja, não puderam ser classificados a partir da base de dados SpolDB4 (Tabela 5).

Evidenciou-se uma distribuição diversificada das famílias no território de Salvador, sendo que a família LAM seguiu a tendência da distribuição população do estudo, com maior proporção de casos no 11° DS Subúrbio Ferroviário, seguido do 9° DS Cabula/Beiru e 3° DS de São Caetano/Valéria (Tabela 6; figura 4).

Os 3° DS de São Caetano/Valéria e 11° DS Subúrbio Ferroviário contemplaram juntos aproximadamente 45% dos isolados da família Haarlem. Houveram casos da família T em todos os distritos sanitários, exceto no 1° DS Centro Histórico e nos 7° DS Boca do Rio e 8° DS Itapuã, que são áreas contíguas (Tabela 6; figura 4).

A família U apresentou seis (40%) dos seus 15 casos, residentes no 11° DS Subúrbio Ferroviário. Identificou-se uma maior proporção de casos da família X no 9° DS Cabula/Beiru (7/ 29,2%) (Tabela 6; figura 3).

As subfamílias mais prevalentes foram: LAM9 (22,3%), LAM3 (10%), Haarlem3 (9,7%), LAM6 (8,5%), LAM4 (7,4%), U (5,6%) e T1 (5,2%) (Tabela 7). Do total de perfis com cinco ou menos cópias do *IS6110*, a maioria pertenceu às subfamílias X1, X2 e X3, com exceção de dois isolados que foram Haarlem 3 e T5 – MAD2 (figura 2). A subfamília X3 apresentou seis casos e quatro destes (66%) foram residentes do 9° DS Cabula/Beiru, especificamente nos bairros Engomadeira, Sussuarana e Tancredo Neves.

A Tabela 3 - Anexo I ilustra o número e proporção de isolados em cada subfamília com seus respectivos SITs e padrões binários. Observou-se que o SIT 42, que corresponde à subfamília LAM9, possui o maior número de

isolados na população do estudo (19,3%). Em seguida, o SIT 33/subfamília LAM3 (26/ 9,6%) e com 23 isolados o SIT 50/subfamília Haarlem3 foram os mais prevalentes. O número de isolados em cada tipo de padrão órfão identificado está representado na Tabela 4 – Anexo I e observou-se que alguns destes foram agrupáveis em dois a três isolados.

A tabela 5 – Anexo I apresenta a diversidade de perfis obtidos pelo RFLP *IS6110* em cada subfamília por *spoligotyping*. O SIT 42/subfamília LAM9 possuiu quarenta padrões distintos no RFLP *IS6110*, com dezessete isolados distribuídos em seis *clusters*. A subfamília LAM3/ SIT 33 teve vinte padrões diferenciados e foi representada em dois *clusters*. Por outro lado, cinco isolados pertenceram ao SIT 4, subfamília LAM3 E S /Convergent, e destes quatro foram agrupados em dois *clusters* distintos (BA10 e BA17) denotando menor diversidade nos padrões de RFLP *IS6110*.

O SIT 238 da subfamília U teve dois casos em *cluster* (BA22), ambos moradores do 11° DS Subúrbio Ferroviário, nos bairros de Ilha de Maré e Periperi. Neste SIT, os padrões que não foram idênticos por RFLP, apresentaram diferenças em duas/três bandas do *IS6110*.

Do total de sete isolados que formam o SIT 47/subfamília Haarlem1, mesmo aqueles que não foram agrupados em *cluster* pelo RFLP *IS6110*, a diferença entre os perfis foi de duas a três bandas *IS6110*, sendo que todos os casos residiam nos distritos sanitários São Caetano, Subúrbio Ferroviário e Itapagipe; região noroeste da cidade.

4. DISCUSSÃO

Esta foi a primeira investigação de base populacional realizada na Bahia que descreveu a diversidade genotípica de *M. tuberculosis* isolados dos casos de TB pulmonar residentes em Salvador e sua distribuição em diferentes distritos sanitários.

A população estudada possui características sócio-demográficas semelhantes aos pacientes notificados com TB em Salvador (SMS, 2010) apresentando maior proporção em indivíduos do sexo masculino e predominância em idade economicamente ativa. A amostra correspondeu a 14% do total de casos de TB pulmonar bacilífera notificados no período. Além disto, foram selecionados somente os casos com baciloscopia positiva, possibilitando a identificação de cepas em potencial transmissão.

A maioria dos casos analisados foi residente no distrito sanitário do Subúrbio Ferroviário, similar aos achados de Costa *et al* (2005), que em seu estudo cerca de 21%, dos participantes foram originários desta região de Salvador. Além disto, avaliando a distribuição espacial da mortalidade por tuberculose na cidade, Mota *et al* (2003) mostraram que o maior risco de óbito pela doença foi observado também neste DS, cuja população é caracterizada pelo nível mais baixo de renda e escolaridade da capital baiana.

Um dos principais resultados deste estudo foi que 23,3% dos isolados de *M. tuberculosis* agruparam - se em vinte sete *clusters* distintos. No Brasil, a caracterização de *M. tuberculosis*, utilizando a mesma técnica, possibilitou a identificação de grupos genéticos similares e as proporções de *clusters* encontradas variaram entre 19% e 37% (Fandinho *et al*, 2000; Suffys *et al*, 2000; Ferrazoli *et al*, 2000; Malaspina *et al*, 2004; Borges *et al*, 2004).

Observou-se uma grande variabilidade nos perfis genéticos de *M. tuberculosis* circulantes em Salvador. Nossos achados coincidem com os de Suffys *et al* (2000), que identificaram padrões de RFLP *IS6110* altamente polimórficos no Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul. Estudos realizados a nível nacional têm demonstrado uma relação entre estes padrões e a origem geográfica das cepas de *M. tuberculosis*, sendo que as frequências de *clusters*

são influenciadas também pela prevalência de TB e políticas de controle locais (Suffys *et al*, 2000).

Estes achados são úteis para avaliar o desempenho dos programas de prevenção e controle da TB, visto que em comunidades onde isto é realizado de forma ineficiente existe alta prevalência de casos em *clusters* (Lambregts-van-Weezenbeek *et al*, 2003). Deste modo, os serviços de saúde municipais são capazes de inferir quanto à ocorrência de transmissão ativa em sua região e propor novas medidas, como por exemplo, o rastreamento de grupos de risco.

Embora ligações epidemiológicas específicas não tenham sido investigadas nos grupos identificados, sugere – se que a prevalência de TB na população de Salvador pode ser fortemente influenciada pela variabilidade de estirpes de *M. tuberculosis* que circulam ativamente na capital. O emprego de RFLP com pareamento exato, utilizado neste estudo para inferir transmissão recente, em situação de alta heterogeneidade genética de *M. tuberculosis* podem ocasionar subestimativa dos resultados (Scott *et al*, 2005). Evidências sugerem que os padrões genéticos de bandas *IS6110* mudam ao longo do tempo e das cadeias de transmissão e esta taxa de mudança pode ocasionar grandes diferenças nas estimativas de transmissão recente, tendo substanciais implicações nas intervenções de saúde pública (Benedetti *et al*, 2010).

Alguns casos apresentaram diagnósticos realizados em meses subseqüentes e, muitos *clusters* foram compostos por casos residentes em bairros limítrofes ou próximos do município de Salvador e nos mesmos distritos sanitários. Em aproximadamente 90% dos *clusters* pelo menos um caso apresentou duas ou três cruzes na baciloscopia, o que sugere alto potencial de transmissibilidade destas cepas nestes locais.

Cinco casos (1,6%) apresentaram isolados com padrão *IS6110*, denominado “8-band FO-like”, que também foi identificado em outros estados do Brasil (Baptista *et al*, 2002; Borges *et al*, 2004; Ferrazoli *et al*, 2000; Suffys *et al*, 2000) e em outros países da América e continente africano (Sola *et al*, 1997; Wilkinson *et al*, 1997) denotando a circulação internacional destas cepas.

Apesar de o sexo masculino ser considerado fator de risco para desenvolvimento da TB observamos a presença de muitos *clusters* formados por mulheres, indicando uma importante participação do sexo feminino na

manutenção da transmissão da tuberculose. Estes achados são consistentes com os de Mendes *et al* (2008), em uma comunidade na zona norte do Rio de Janeiro, que considerou o maior tempo de permanência das mulheres na comunidade, levando a maior exposição e transmissão.

Em diversos *clusters*, tais como “BA2”, “BA5”, “BA6” e “BA7”, pelo menos um caso teve contato prévio com paciente com tuberculose fora do domicílio. Observou-se também a presença de vários *clusters* formados por indivíduos que moram em distintos bairros e afirmaram ter tido história de contato prévio fora da residência. Isto sugere que além dos contatos domiciliares, relações extradomiciliares podem ter desempenhado um importante papel na transmissão da TB.

Verificou-se a existência de um padrão diversificado na distribuição dos perfis genéticos de *M. tuberculosis* no espaço urbano de Salvador, com maior concentração de casos nos bairros periféricos da cidade, conhecidamente com baixas condições de vida, o que possivelmente tornou os indivíduos mais expostos e mais susceptíveis a tuberculose. Estudo realizado em Madri, para avaliar a transmissão da tuberculose envolvendo imigrantes, identificou que 81% dos *clusters* incluíram pacientes de diferentes distritos de saúde da capital espanhola (Rodríguez *et al*, 2009).

Mendes *et al* (2008), em estudo realizado no Rio de Janeiro identificou que indivíduos que residem em comunidades superlotadas passam a maior parte do tempo fora do local, o que envolve intensos contatos com uma multiplicidade de pessoas em diferentes áreas, facilitando a transmissão. Esta associação com *clusters* tem ocorrido em outras áreas do Brasil e de outros países com características similares (Mendes *et al*, 2008; Oelemann *et al*, 2007; Verver *et al*, 2004). Sendo assim, as áreas identificadas merecem ser priorizadas nas ações de controle da TB visando à melhor racionalização dos recursos e redução da transmissão.

Outro achado importante foi que os distritos sanitários que concentraram a maior frequência de casos não foram necessariamente os mesmos que alocaram as maiores proporções de casos em *clusters*. Deste modo, 9° DS Cabula/Beiru apresentou maior frequência de casos em *cluster* e houve associação estatisticamente significativa residir neste distrito sanitário e pertencer a *cluster*. Em áreas urbanas com alta incidência de TB, sugere-se

que a formação de *clusters* tende a ocorrer mais frequentemente entre isolados de pacientes que residem em áreas nas quais a incidência é maior (Verver *et al*, 2004; Small *et al*, 1994; Barnes & Cave 2003; Lambregts-van Weezen-beek *et al*, 2003; Munsiff *et al*, 2003; Seidler *et al* 2004). O 9° DS Cabula/Beiru apesar de apresentar o maior número de casos de TB em Salvador, ocupou a 6ª posição na incidência de TB pulmonar em 2009 (10,5/10.000 habitantes), em relação aos demais DS (SMS/SUIS-SINANNET, 2009).

Possivelmente pobreza, superlotação, aumento da circulação humana e peculiaridades sócio-demográficas neste DS contribuíram para este achado similar a Oeleman *et al* (2007), que identificou uma área específica do Rio de Janeiro, associada a agrupamento em *clusters*.

Diversos estudos têm identificado características associadas à tuberculose devido à infecção recente e formação de *clusters*, incluindo tratamento prévio, resistência aos fármacos, uso de drogas, minorias étnicas, baixas condições de vida e aglomerações (Small *et al*, 1994; Alland *et al*, 1994, Maconkey *et al*, 2002; Farnia *et al*, 2008). Neste estudo, não foi encontrada associação estatisticamente significativa entre pertencer a *cluster* e as demais variáveis demográficas e clínicas analisadas.

Além disto, observamos o agrupamento de famílias de *M. tuberculosis* que possuem grande importância epidemiológica, tais como Haarlem, S, T, X, U, EAI e LAM. Nossos achados são similares aos encontrados na região Sul do Brasil, em outros países da América Latina e Europa (Silva *et al*, 2009; Candia *et al*, 2007; Durmaz *et al*, 2007).

Estudos que segregam *M. tuberculosis* de acordo com famílias são importantes devido ao reconhecimento de sub - populações específicas e/ou clones com traços genéticos únicos e/ou padrões de doença clínica particulares para auxiliar no entendimento do papel de genes específicos na patogenicidade da doença e podem ter impacto nas estratégias para controle da TB (Lazzarini *et al*, 2007).

As cepas mais prevalentes em Salvador são das famílias de *M. tuberculosis* de evolução recente pertencentes ao grupo genético principal 2 (PGG2), tais como Haarlem e LAM e grupo genético principal 3 (família T) (Durmaz *et al*, 2007), que além de serem as maiores famílias genotípicas, são

as mais frequentemente encontradas no continente americano, África e Europa (Brudey *et al*, 2006).

Dados indicam que certos genótipos de *M. tuberculosis* bem conservados prevalecem em determinadas áreas com alta incidência porque eles são adaptados a populações humanas específicas (Gagneux *et al*, 2006). Além disto, recentes evidências sugerem que cepas de *M. tuberculosis* com alguns genótipos podem ser mais virulentos, contribuindo para o agravamento das infecções ou resistência aos medicamentos (Lopez *et al*, 2003).

A família LAM foi responsável por 50,6 % das infecções em Salvador, próximo a proporção identificada no Rio de Janeiro no qual 58% dos isolados foram pertencentes a esta família (Lazzarini *et al*, 2007). Além disto, estima-se que cerca de 50% de todas as cepas circulantes na América do Sul são pertencentes a família LAM (Brudey *et al*, 2006). Embora as famílias Beijing, Haarlem e EAI tenham sido validada por outros investigadores (Ferdnand *et al*, 2004), a família LAM têm sido bem menos definida e é desproporcionalmente menos estudada, apesar da sua grande importância. Deste modo, descrição mais detalhada de clones da família LAM é necessária.

Identificamos em Salvador, um isolado pertencente à família EAI, prevalente no sudeste Asiático, especificamente no sul da Índia, continente africano e algumas regiões da Europa. Estas cepas são consideradas menos virulentas, podem não ser letais e estão menos frequentemente associadas com resistência a drogas. (Narayanan *et al*, 2008; Arora *et al*, 2009).

Uma proporção de cepas não foi identificada na base de dados internacional, com agrupamento de alguns destes padrões órfãos. Este achado necessita ser melhor avaliado para confirmar a possibilidade de novas cepas circulantes no município.

As subfamílias mais prevalentes em Salvador foram LAM9, LAM3, Haarlem3, LAM6, LAM4, U e T1. Deste modo, a diversidade de famílias de *M. tuberculosis* em Salvador é condizente com a heterogeneidade populacional e uma sociedade mista com múltiplas introduções de tipos clonais provenientes de outros locais.

Em relação aos SITs compartilhados, o SIT 42, que corresponde à subfamília LAM9, que originou a família LAM (Brudey *et al*, 2006), possui maior prevalência em Salvador, alocando 19,3% dos isolados. Em seguida, os mais

predominantes em nosso estudo foram SIT 33 e o SIT 50, que são amplamente distribuídos pelo mundo (Brudey *et al*, 2006).

Demonstramos que em Salvador, a população de *M.tuberculosis* foi heterogênea, incluindo SITs comumente encontrados em outros continentes, tais como o SIT 33 e SIT 50. Os SITs, 161 e 238 até o momento foram identificados somente em países da Europa e América do Norte. Identificamos também SITs específicos do Brasil e países de América do Sul (SIT 392). (Brudey *et al*, 2006)

Tivemos isolados com mesmos SITs circulantes em São Paulo (Malaspina *et al*, 2008), Rio Grande do Sul (Silva *et al*, 2009) e em Portugal (David *et al*, 2004). O SIT 92, família X3 está representado em nosso estudo e na região sudeste do Brasil e ausente na região sul. Estas cepas apresentaram poucas bandas *IS6110*, que é característico da família X (Warren *et al*, 2004).

Verificou-se grande diversidade de assinaturas pelo RFLP em isolados da família LAM. O SIT 42 possui quarenta padrões distintos no RFLP *IS6110*, com isolados pertencentes a seis *clusters*. A alta diversidade em padrões *fingerprinting* de cepas LAM observada por Lazzarini *et al* (2007) no Rio de Janeiro, reforça a hipótese que a família LAM tem relativamente uma longa história de circulação no Brasil. A alta prevalência desta família no Sudeste da Europa e acerca da Bacia do Mediterrâneo, e sua presença na América do Sul e Caribe pode estar relacionada primeiramente com a história colonial européia particularmente o império espanhol (Brudey *et al*, 2006).

A prevalência de cepas em determinadas regiões, como por exemplo, a cepa RD^{RIO} no Rio de Janeiro, sugere uma vantagem seletiva das cepas com este genótipo com relação à sua capacidade de estabelecer infecção e/ou sua habilidade de produzir doença. Além disto, o sucesso destas cepas pode ser devido a diferenças na expressão de genes de fatores de virulência ou na evasão imune e/ou pode estar relacionado com características ambientais, culturais e genéticas da população hospedeira. A relativa virulência de cepas *M. tuberculosis* RD^{RIO} é mais provavelmente o desfecho de uma longa e complexa interação dinâmica entre hospedeiros e propriedades do microrganismo (Lazzarini *et al*, 2006).

Hirsh *et al* (2004) sugeriu que a adaptação de cepas de *M. tuberculosis* em diferentes populações de hospedeiros é responsável pela expansão do

microrganismo dentro de grupos étnicos definidos. Seu estudo indica que *M. tuberculosis* é organizado em grandes populações diferenciadas geneticamente, que são estavelmente associadas com populações de hospedeiros definidas geograficamente e que a forte associação entre o local de nascimento do hospedeiro e a infecção por determinado genótipo não é somente devido ao movimento individual das famílias de *M. tuberculosis* acerca de distintas populações humanas.

Estudos apontam que certas linhagens causam tuberculose ativa preferencialmente em populações humanas com distintos ancestrais genéticos (Hirsh *et al*, 2004; Gagneux *et al*, 2006). Entretanto, as causas de associações de linhagens específicas com regiões geográficas são desconhecidas. Sugere-se que a biogeografia de cepas de *M. tuberculosis* está relacionada a migrações de ancestrais humanos (Hershberg *et al*, 2008) e que cepas podem ter se adaptado a populações de hospedeiros humanos específicos no decorrer do tempo (Gagneux *et al*, 2006).

Isto destaca a importância de examinar outros fatores que potencialmente podem impactar nos desfechos de tratamento, quando é avaliada a relação entre genótipos e a resposta a terapia (Nahid *et al*, 2010). Estudos adicionais são necessários para determinar se as linhagens filogenéticas encontradas em Salvador influenciaram nos desfechos do tratamento, incluindo falência e recidiva da doença.

Verificamos uma distribuição diversificada das famílias de *M. tuberculosis* no município de Salvador. Os DS de São Caetano/Valeria e Subúrbio Ferroviário, que possuem proximidade geográfica, contemplam juntos quase a metade dos isolados da família Haarlem. A subfamília X3 apresenta 66% dos casos são residentes do 9º DS Cabula/Beiru. Apesar do intercâmbio de populações observa-se uma distribuição geográfica das famílias de *M. tuberculosis* em Salvador. Sendo assim, existe a necessidade de conhecer como tipos de cepas em particular causam uma alta carga de doença em determinadas áreas (Arora *et al*, 2009).

Distintas cepas de *M. tuberculosis* diferem em relação às taxas de transmissão devido à variação genética entre cepas, devendo considerar fatores relacionados com a cepa emergente, tais como genes bacterianos e fatores do hospedeiro ou ambientais, assim como a combinação de ambos. Isto

é, a associação de determinado genótipo com a rápida expansão na população susceptível pode ser não apenas a propriedades biológicas das cepas como pela configuração de redes sociais fundamentais para a transmissão (Tanaka & Francis, 2006).

A distribuição heterogênea de *clusters* e famílias genóticas de *M. tuberculosis* identificada neste trabalho sugere a existência de uma relação com espaço, que possui estreita associação com as condições sócio - econômicas e culturais das populações. Deste modo, tornam-se necessárias avaliações posteriores para investigar quais fatores populacionais podem estar relacionados aos padrões moleculares encontrados.

Assim, a identificação dos espaços com maior probabilidade de infecção por determinados clones de *M. tuberculosis*, pode constituir-se em subsídio para a formulação de políticas de saúde capazes de melhorar o rastreamento dos casos e controle da transmissão voltada para população residente nestas áreas, fornecendo elementos para destacar os principais aspectos da cadeia de transmissão da tuberculose. Estudos adicionais, de caráter prospectivo, envolvendo todas as culturas positivas para *M.tuberculosis* são necessários para monitorar a evolução da transmissão da TB no perímetro urbano de Salvador.

Salientamos a importância da incorporação de informações moleculares e dados referentes aos genótipos circulantes no sistema de vigilância epidemiológica, com o objetivo de monitorar a ocorrência destas cepas e sua relação com possíveis reinfecções, infecções múltiplas, resistência a drogas, quadros clínicos diferenciados, desfechos no tratamento, etc. bem como, planejar ações intersetoriais criando subsídios para a tomada de decisões no sentido de contribuir para o controle da enfermidade, de acordo com as necessidades específicas de cada área (Munch *et al*, 2003; Xavier & Barreto, 2007).

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os dados apresentam um panorama preliminar sendo de interesse para a compreensão da epidemiologia da tuberculose em Salvador. Considerando os objetivos propostos, foi possível observar que os casos com tuberculose pulmonar residente em Salvador foram infectados por uma população geneticamente diversificada de *Mycobacterium tuberculosis*.

Além disto, é notória a existência de uma circulação diferencial entre os perfis e famílias genéticas nos diferentes espaços de Salvador, indicando transmissão ativa de determinados perfis em áreas específicas, sendo necessária a realização de estudo de análise espacial mais refinada, com a integração de dados e metodologias de genotipagem e georeferenciamento.

REFERÊNCIAS

Alland DG, Kalkut E, Moss AR, Mcadam RA, Hahn JA, Bosworth W, *et al.* Transmission of tuberculosis in New York City. An analysis by DNA fingerprinting and conventional epidemiologic methods. *N.Engl.J. Med.* 1994;17: 1710-1716.

Arora J, Singh BU, Suresh N, Rana T, Porwal C, Kaushik A, *et al.* Characterization of predominant *Mycobacterium tuberculosis* strains from different subpopulations of India. *Infection, Genetics and Evolution.* 2009; 581:1–8.

Baptista IMFD, Oelemann MC, Opromolla DVA, Suffys PN. Drug Resistance and Genotypes of Strains of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from Human Immunodeficiency Virus-infected and Non-infected Tuberculosis Patients in Bauru, São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002; 97:1147-52.

Barnes PF, Cave MD. Molecular epidemiology of tuberculosis. *N Engl J Med.* 2003; 349(12):1149–1156.

Benedetti A, Menzies D, Behr MA, Schwartzman K, Jin Y. How close is close enough? Exploring matching criteria in the estimation of recent transmission of tuberculosis. *Am J Epidemiol.* 2010 ;172(3):318-26.

Borges M, Cafrune PI, Possuelo LG, Valim ARM, Ribeiro MO, Rossetti MLR. Análise molecular de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* provenientes de um centro de saúde ambulatorial em Porto Alegre, (RS). *J Bras Pneumol.* 2004; 30(4) 448-54.

Brasil, 2009. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância Epidemiológica. Tuberculose. Dados e indicadores. Epidemiologia da TB no Brasil. Disponível em <<http://portal.saude.gov.br/saude>>. Acessado em: 20 de novembro de 2010.

Brasil, Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Guia de vigilância epidemiológica. Brasília, 2005; 6ª ed.

Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L, Prodinger WN, Gori A, Al-Hajoi SA, *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiol.* 2006;6:23.

Candia N, Lopez B, Zozio T, Carrivale M, Diaz C, Russomando G, *et al.* First insight into *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity in Paraguay. *BMC Microbiology.* 2007;7:75.

Cheza CVE. Distribuição da tuberculose e condições de vida em Salvador: uma análise espacial. Dissertação de mestrado. Instituto de Saúde Coletiva. Universidade Federal da Bahia. 2009. 86p.

Costa JG, Santos AC, Rodrigues LC, Barreto ML, Roberts JA. Tuberculose em Salvador, Brasil: custos para o sistema de saúde e famílias. *Rev Saúde Pública*.2005;39(1):122-8.

Cowan LS, Diem L, Brake MC, Crawford JT. Transfer of a *Mycobacterium tuberculosis* genotyping method spoligotyping, from a reverse line-blot hybridization, membrane-based assay to the Luminex Multianalyte profiling System.*Journal of Clinical Microbiology*.2004; 42:474–477.

David S, Portugal C, Antunes A, Cardoso A, Calado A, *et al.* Molecular identification using *Spoligotyping* of strains from the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from the Hospital Fernando Fonseca. *Rev. Port. Pneumol*.2004;3:193-204.

Dice,LR.Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology*.1945; 26(3):297-302.

Durmaz R, Zozio T, Gunal S, Allix C, Fauville-Dufaux M, Rastogi N. Population-Based Molecular Epidemiological Study of Tuberculosis in Malatya, Turkey. *Journal of Clinical Microbiology*.2007; 45 (12):4027–4035.

Fandinho FCO, Kritski AL, Hofer C, Conde HR, Ferreira RMC, Saad MHF, *et al.* RFLP patterns and risk factors for recent tuberculosis transmission among hospitalized tuberculosis patients in Rio de Janeiro, Brazil.*Trans Royal Soc Trop Med and Hygiene*.2000; 94:271-5.

Farnia, P, Masjedi RM, Varaham M, Mirsaeidi M, Ahmadi M, Khazampour M, *et al.* Evaluation of tuberculosis transmission in Tehran: using RFLP and spoligotyping methods. *J Infect*. 2004;49(2): 94-101.

Ferdinand S, Valétudie G, Sola C, Rastogi. Data mining of *Mycobacterium tuberculosis* complex genotyping results using mycobacterial interspersed repetitive units validates the clonal structure of spoligotyping-defined families. *Res. Microbiol*. 2004;155:647–654.

Ferrazoli L, Palaci M, Marques MRL, Jamal FL, Afiune BJ, Chimara E, *et al.* Transmission of tuberculosis in an endemic urban setting in Brazil. *Int. J. Tuberc. Lung. Dis*.2000; 4:1-8.

Gagneux S, DeRiemer K, Van T, Kato-Maeda M, Jong BC, Narayanan S, *et al.* Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2006;103:2869–2873.

Glynn JR, Yates MD, Crampin AC, *et al.* DNA fingerprint changes in tuberculosis: reinfection, evolution, or laboratory error? *J Infect Dis*. 2004; 190(6):1158–1166.

Haarse I, Olson S, Behr MA, Wanyeki I, Thibert L, Scott A.Use of geographic and genotyping tools to characterise tuberculosis transmission in Montreal. *Int. J. Tuberc. Lung Dis*. 2007;11:632–638.

Hershberg R, Lipatov M, Small PM, Sheffer H, Niemann S, *et al.* High functional diversity in *Mycobacterium tuberculosis* driven by genetic drift and human demography. *PLoS Biol.*2008;6:e311.

Hirsh AE, Tsolaki AG, DeRiemer K, Feldman MW, Small PM. Stable association between strains of *Mycobacterium tuberculosis* and their human host populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*2004;101:4871–4876.

IBGE.Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/>. Acessado 15 de dezembro de 2010.

Kulaga S, Behr MA, Schwartzman K. Genetic fingerprinting in the study of tuberculosis transmission. *Can Med Assoc J.*1999;161:1165–9.

Lambregts-van-Weezenbeek CSB, Sebek MMGG, van Gerven PJHJ, Vries G, Kalisvaart NA, *et al.* Tuberculosis contact investigation and DNA fingerprint surveillance in The Netherlands: 6 years' experience with nation-wide cluster feedback and cluster monitoring. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2003;7: 463-470.

Lazzarini OCL, Huard CR, Boechat LN, Gomes MH, Oelemann CM, Kurepina N, *et al.* Discovery of a novel *Mycobacterium tuberculosis* lineage that is a major cause of tuberculosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Clinical Microbiology.*2007;45(12):3891–3902.

Lopez B, Aguilar D, Orozco H, Burger M, Espitia C, Ritacco V, *et al.* A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. *Clin Exp Immunol.*2003; 133 (1):30-37.

Malaspina AC, Cavalcanti HR, Leite CQ, Machado SM, Viana BH, Silva RM, *et al.*Usefulness of *Mycobacterium tuberculosis* molecular typing in a tuberculosis low-endemic agro-industrial setting of Brazil. *J. Infect. Dis.* 2008; 61:231-233.

Maconkey SJ, Williams M, Weiss D, Adams H, Cave DM, Yang Z, *et al.* Prospective use of molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* by use of restriction fragment-length polymorphism in a public tuberculosis-control program. *Clin. Infect. Dis.* 2002; 34:612-619.

Mendes MJ, Machado AMS, Lourenço CM, Ferreira CMR, Fonseca SL, Saad FHM. Molecular diversity of *Mycobacterium tuberculosis* strains in slum area of Rio de Janeiro, Brazil. *Journal Braz Pneumology.* 2008;34 (12):1063-1068.

Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Centro de Referência Prof. Hélio Fraga. Manual de Bacteriologia da Tuberculose. 2005. Rio de Janeiro; 3ªed.

Moström P, Gordon M, Sola C, Ridell M, Rastogi N. Methods used in the molecular epidemiology of tuberculosis. *Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2002;8:694-704.

Mota FF, Silva LMV, Paim JS, Costa MCN. Distribuição espacial da mortalidade por tuberculose em Salvador, Bahia, Brazil. *Caderno de Saúde Pública*, Rio de Janeiro.2003;19(4):915-922.

Munch Z, van Lill SW, Booyesen CN, Zietsman HL, Enarson DA, Beyers N. Tuberculosis transmission patterns in a high-incidence area: a spatial analysis. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2003 Mar;7(3):271-7.

Munsiff SS, Nivin B, Sacajiu G, Mathema B, Bifani P, Kreiswirth BN. Persistence of a highly resistant strain of tuberculosis in New York City during 1990-1999. *J Infect Dis*. 2003;188(3):356-63.

Murray M. Determinants of cluster distribution in the molecular epidemiology of tuberculosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.2002;99:1538-43.

Murray M, Alland D. Methodological problems in the molecular epidemiology of tuberculosis. *Am J Epidemiol*.2002;155:565-71.

Nahid P, Bliven EE, Kim YE, Mac Kenzie RW, Stout EJ, Diem L, *et al*. Influence of *M. tuberculosis* lineage variability within a clinical trial for pulmonary tuberculosis. *PLoS Biol*.2010;5(5): e10753.

Narayanan S, Das S, Garg R, Hari L, Rao BV, Frieden RT, *et al*. Molecular epidemiology of tuberculosis in a rural area of high prevalence in south India: implications for disease control and prevention. *J. Clin. Microbiol*. 2002; 40: 4785-4788.

Oelemann Mc, Fontes Anb, Pereira Mas, Bravin Y, Silva G, Degrave W, Carvalho Acc, Brito Rc, Kritski Al, Suffys Pn. Typing of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in community health centers of Rio de Janeiro city, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2007;102(4): 455-462.

Oliveira MMS, Oliveira HB, Pace F, Stehling EG, Rocha MMM, Aily DCG *et al*.Molecular genotyping and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* isolates obtained from inmates of correctional institutions of Campinas, Southeast Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2008;12(6):487-493.

Prefeitura de Salvador. SMS/SINANNET. Disponível em <<http://www.salvador.ba.gov.br>>.Acessado em 19 de novembro de 2010.

Rodriguez NA, Chaves F, Inigo J, Bouza E, Viedma GD & TB Molecular Epidemiology Study Group of Madrid. Transmission permeability of tuberculosis involving immigrants, revealed by a multicentre analysis of clusters. *Clin Microbiol Infect*.2009;15:435-442.

Scott AN, Menzies D, Tannenbaum TN, Thibert L, Kozak R, Joseph L, *et al*. Sensitivities and specificities of spoligotyping and mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing methods for studying molecular epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol*.2005; 43(1):89-94.

Secretaria da Saúde do Estado da Bahia (SESAB). Disponível em: <<http://www.saude.ba.gov.br/divep>>. Acessado 19 de novembro de 2010.

Secretaria Municipal de Saúde de Salvador. Prefeitura de Salvador. Plano Municipal de Saúde: 2010 - 2013

Seidler A, Nienhaus A, Diel R. The transmission of tuberculosis in the light of new molecular biological approaches. *Occup Environ Med.* 2004;61:96–102.

Silva ABS, Groll AV, Felix C, Conceição FR, Spies FS, Scaini CJ, *et al.* Clonal diversity of *M. tuberculosis* isolated in a sea port city in Brazil. *Tuberculosis.* 2009 ;89 :443-447.

Small PM, Hopewell CP, Singh PS, Paz A, Parsonnet J, Ruston DC, *et al.* The epidemiology of tuberculosis in San Francisco. A population-based study using conventional and molecular methods. *N. Engl. J. Med.* 1994; 330:1703-1709.

Sola C, Horgen L, Goh KS, Rastogi N. Molecular fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* on a Caribbean island with IS6110 and DR probes. *J Clin Microbiol.* 1997;35:843-846.

Suffys PN, Araújo IME, Rossetti LM, Zaha A, Barroso WE, Barreto WMA, *et al.* Usefulness of IS6110-restriction fragment length polymorphism typing of Brazilian strains of *Mycobacterium tuberculosis* and comparison with an international fingerprint database. *Res. Microbiol.* 2000;151:343-351.

Tanaka & Francis, 2006 Tanaka MM, Francis RA. Detecting emerging strains of tuberculosis by using spoligotypes. *PNAS.* 2006;103(41):15266 – 15271

Telenti A, Iseman M. Drug-resistant tuberculosis: what do we do now? *Drugs.* 2000;59(2):171-9.

Uthman OA. Spatial and temporal variations in incidence of tuberculosis in Africa, 1991 to 2005. *World Health Popul.* 2008;10(2):5-15.

van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, *et al.* Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol.* 1993;31:406-409.

Verver S, Warren RM, Munch Z, Richardson M, van der Spuy GD, Borgdorff MW, *et al.* Proportion of tuberculosis transmission that takes place in households in a high-incidence area. *Lancet.* 2004;363 (9404):212-4.

Vries G, van Hest AHR, Burdo CAC, van Sooligen D, Richardus HJA. *Mycobacterium tuberculosis* cluster demonstrating the use of genotyping in urban tuberculosis control. *BMC Infectious Diseases.* 2009;9:1-8.

Warren RM, Victor TC, Streicher EM, Richardson M, van der Spuy GD, Johnson R, *et al.* Clonal expansion of a globally disseminated lineage of *Mycobacterium tuberculosis* with low IS6110 copy numbers. *J Clin Microbiol.* 2004;42(12):5774-82.

WHO (World Health Organization). Global Tuberculosis Control: WHO Report 2010. World Health Organization, Geneva.

Wilkinson D, Pillay M, Crump J, Lombard C, Davies RG, Sturm WA. Molecular epidemiology and transmission dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* in rural Africa. *Tropical Medicine and International Health.* 1997(8)747–753.

Xavier, MIM & Barreto, ML. Tuberculose na cidade de Salvador, Bahia, Brasil: o perfil na década de 1990. *Caderno de Saúde Pública.* Rio de Janeiro. 2007; 23(2): 445-453.

TABELAS

Tabela 1: Características da população de estudo. Salvador, Bahia, agosto de 2008 a dezembro de 2009

VARIÁVEIS	n *	%
Faixa etária		
15 - 19	30	9,2
20 - 34	142	43,5
35 - 49	85	26,1
50 e +	69	21,2
Sexo		
Masculino	190	58,3
Feminino	136	41,7
Raça/Cor		
Branca	40	12,4
Parda	199	61,8
Negra	71	22,1
Amarela e Indígena	12	3,7
Escolaridade		
Analfabeto/Apenas alfabetizado	76	23,6
Ensino Fundamental incompleto e completo	129	40,1
Ensino Médio incompleto e completo	111	34,5
Superior Incompleto	6	1,8
Situação do domicílio		
Próprio	241	79
Alugado	44	14,4
Outros ¹	20	6,6
Situação empregatícia		
Empregado	223	81,07
Desempregado	51	18,61
Residência do caso ou membro da família		
Rua	15	5,1
Albergue	10	3,4
Prisão	9	3,0
Não se aplica	259	88,5
Naturalidade		
Salvador	210	68,9
Outros municípios	84	27,5
Outros Estados	11	3,6

VARIÁVEIS	n *	%
Tabagismo		
Sim	51	16,7
Não	254	83,3
Consumo de álcool		
Sim	112	37
Não	191	63
Drogas ilícitas		
Sim	16	5,3
Não	289	94,7
História de contato		
Sim	75	24,6
Não	178	58,4
Não sabe	52	17
Padrão radiológico		
Suspeito	266	81,6
Normal	3	0,9
Não realizado	57	17,5
Cicatriz Vacinal		
Sim	232	76,1
Não	73	23,9
Teste HIV		
Realizado	86	26,3
Não realizado	240	73,6
Sorologia HIV		
Positiva	3	3,5
Negativa	77	89,5
Inconclusiva	6	7

* Número de casos difere em cada variável

1 Situação do domicílio: cedido, em ocupação, sublocado, na rua, etc.

Tabela 2: Número e frequência de casos de tuberculose pulmonar por distrito sanitário de residência. Salvador, Bahia, agosto de 2008 a dezembro 2009

DISTRITO SANITÁRIO	n	%
11° DS Subúrbio Ferroviário	68	20,9
9° DS Cabula/Beiru	59	18,1
3° DS São Caetano/ Valéria	58	17,8
4° DS Liberdade	30	9,2
2° DS Itapagipe	23	7,1
6° DS Barra/ Rio Vermelho/ Pituba	22	6,7
10° DS Pau da Lima	19	5,8
5° DS Brotas	14	4,3
12°DS Cajazeiras	12	3,7
1° DS Centro Histórico	8	2,5
8° DS Itapuã	7	2,1
7° DS Boca do Rio	6	1,8
TOTAL	326	100

Tabela 3: Frequência dos casos em *cluster* e não *cluster* por distrito sanitário de residência. Salvador, Bahia, agosto de 2008 a dezembro de 2009

DISTRITO SANITÁRIO	NÃO CLUSTER		CLUSTER		TOTAL	
	n	%	n	%	n	%
9° DS Cabula/Beiru	35	66	18	34	53	100
11° DS Subúrbio Ferroviário	47	71,3	19	28,7	66	100
3° DS São Caetano/ Valéria	42	79,3	11	20,7	53	100
1° DS Centro Histórico	4	66,7	2	33,3	6	100
7° DS Boca do Rio	4	66,7	2	33,3	6	100
12°DS Cajazeiras	7	70	3	30	10	100
10° DS Pau da Lima	15	78,9	4	21,1	19	100
2° DS Itapagipe	16	80	4	20	20	100
5° DS Brotas	11	84,6	2	15,4	13	100
8° DS Itapuã	6	85,7	1	14,3	7	100
6° DS Barra/ Rio Vermelho/ Pituba	18	90	2	10	20	100
4° DS Liberdade	25	92,6	2	7,4	27	100
TOTAL	230	76,7	70	23,3	300	100

Tabela 4: Razões de prevalência e respectivos intervalos de confiança para associação entre variáveis descritoras e *clusters*. Salvador, Bahia, agosto de 2008 a dezembro de 2009

VARIÁVEIS	n*	RP	IC 95%
Sexo			
Masculino	172	0,99	0,65 – 1,50
Feminino	128	1,0	
Naturalidade			
Salvador	190	0,81	0,53 – 1,26
Outros locais	89	1,0	
Tabagismo			
Sim	46	1,01	0,57 – 1,78
Não	233	1,0	
Consumo de álcool			
Sim	103	0,84	0,53 – 1,32
Não	174	1,0	
Drogas ilícitas			
Sim	13	0,97	0,35 – 2,69
Não	266	1,0	
Cicatriz Vacinal			
Sim	215	1,0	
Não	64	0,98	0,59 – 1,63
História de contato			
Sim	70	1,06	0,65 – 1,72
Não	161	1,0	
Moradia em Rua, Albergue, Prisão			
Sim	31	1,07	0,56 – 2,03
Não	237	1,0	
Faixa etária			
15 - 19	29	0,41	0,14 – 1,24
20 - 34	132	1,20	0,79 – 1,81
35 - 49	78	0,84	0,51 – 1,38
50 e +	61	1,25	0,78 – 2,00
Escolaridade			
Analfabeto/Apenas alfabetizado	69	1,18	0,74 – 1,80
Ensino Fundamental (inc. e completo)	115	1,10	0,72 – 1,68
Ensino Médio (inc. e completo)	107	0,78	0,49 – 1,24
Superior (inc. e completo)	5	0,86	0,14 – 5,07
Raça/Cor			
Branca	40	0,82	0,42 – 1,59
Parda	175	1,24	0,80 – 1,91
Negra	69	0,89	0,54 – 1,48
Amarela e Indígena	12	0,69	0,19 – 2,50
Distrito Sanitário de Residência			
1° DS Centro Histórico	6	1,44	0,45 – 4,55
2° DS Itapagipe	20	0,84	0,34 – 2,09
3° DS São Caetano/ Valéria	53	0,86	0,49 – 1,53
4° DS Liberdade	27	0,29	0,07 – 1,14
5° DS Brotas	13	0,64	0,17 – 2,36
6° DS Barra/ Rio Vermelho	20	0,41	0,10 – 1,55
7° DS Boca do Rio	6	1,44	0,45 – 4,55
8° DS Itapuã	7	0,60	0,09 – 3,76
9° DS Cabula/Beiru	53	1,61	1,03 – 2,52
10° DS Pau da Lima	19	0,89	0,36 – 2,19
11° DS Subúrbio Ferroviário	66	1,32	0,84 – 2,07
12° DS Cajazeiras	10	1,29	0,49 – 3,42

Tabela 5: Freqüência das famílias de *M. tuberculosis*. Salvador, Bahia, agosto de 2008 a dezembro 2009

FAMÍLIA	n	%
LAM	165	50,6
Haarlem	35	10,7
T	28	8,6
X	24	7,4
U	15	4,6
S	1	0,3
EAI	1	0,3
Padrão Orfão	57	17,5
TOTAL	326	100

Tabela 6: Frequência e proporção das famílias de *M. tuberculosis* por distrito sanitário de residência. Salvador, Bahia, agosto de 2008 e dezembro de 2009**

DS FAMÍLIA	1° DS		2° DS		3°DS		4° DS		5° DS		6° DS		7° DS		8° DS		9° DS		10° DS		11° DS		12°DS		TOTAL	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
LAM	4	2,4	13	7,9	29	<u>17,6</u>	11	6,7	5	3,0	11	6,7	1	0,6	4	2,4	29	<u>17,6</u>	14	8,5	38	<u>23</u>	6	3,6	165	100
HAARLEM	2	5,7	4	11,4	8	<u>22,9</u>	4	11,4	-	-	3	8,6	1	2,9	-	-	4	11,4	-	-	8	<u>22,8</u>	1	2,9	35	100
T	-	-	2	7,1	5	17,9	3	10,7	2	7,1	2	7,1	-	-	-	-	5	17,9	1	3,6	7	25	1	3,6	28	100
U	-	-	-	-	1	6,7	2	13,3	1	6,7	-	-	2	13,3	1	6,6	1	6,7	1	6,7	6	<u>40</u>	-	-	15	100
X	-	-	3	12,5	4	16,7	3	12,5	1	4,2	2	8,3	-	-	-	-	7	<u>29,2</u>	-	-	2	8,3	2	8,3	24	100

** Todas as famílias, exceto EAI e S, visto que só possuem um representante cada

Tabela 7: Freqüência das subfamílias de *M. tuberculosis*. Salvador, Bahia, agosto de 2008 a dezembro 2009

SUBFAMÍLIA	n	%
LAM9	60	22,3
LAM3	27	10,0
HAARLEM3	26	9,7
LAM6	23	8,5
LAM4	20	7,4
U	15	5,6
T1	14	5,2
Outros *	84	33,3
TOTAL	269	100

*EAI5, H1, H2, LAM1, LAM1-LAM4, LAM11_ZWE, LAM2, LAM3 e S/CONVERGENT, LAM5, S, T1 (T4-CE – ANCESTOR?), T1_RUS2, T2, T2-S, T2-T3, T3, T5_MAD2, U, X1, X1-LAM9, X2, X3

FIGURAS

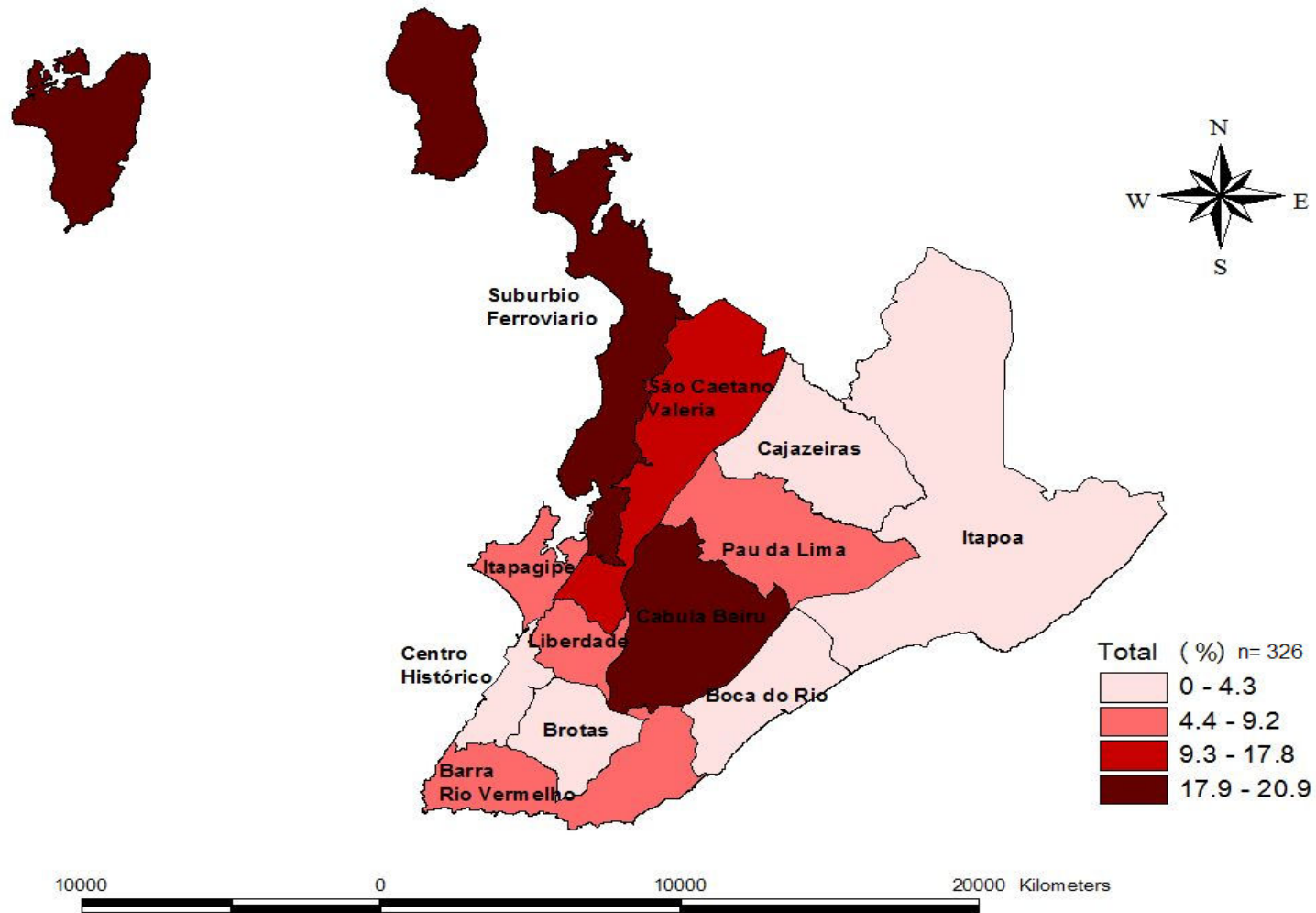


Figura 2 - Proporção da população do estudo por Distrito Sanitário. Salvador, Bahia, agosto de 2008 a dezembro de 2009

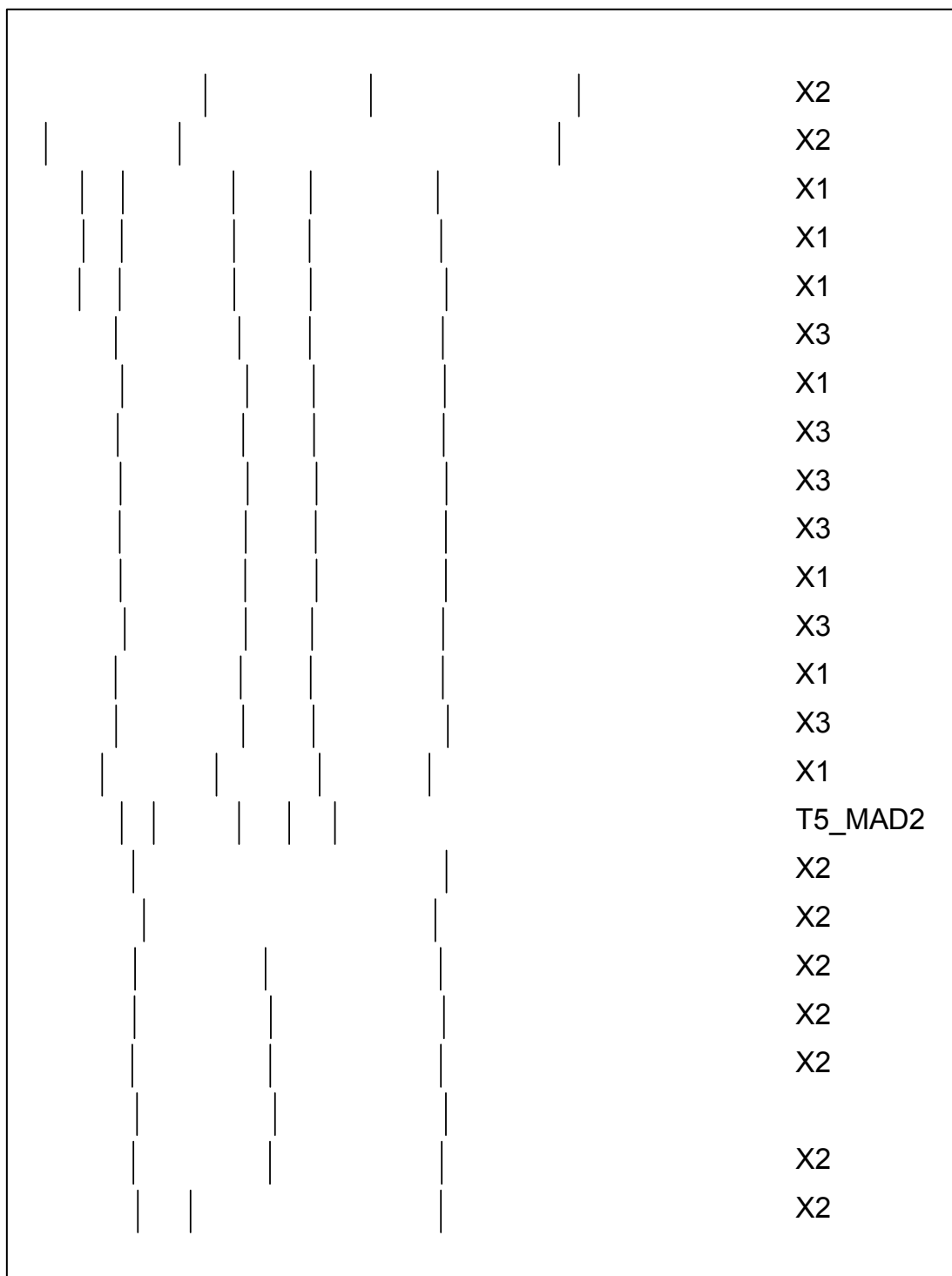


Figura 2: Padrão eletroforético dos isolados de *M.tuberculosis* com cinco ou menos cópias do *IS6110*

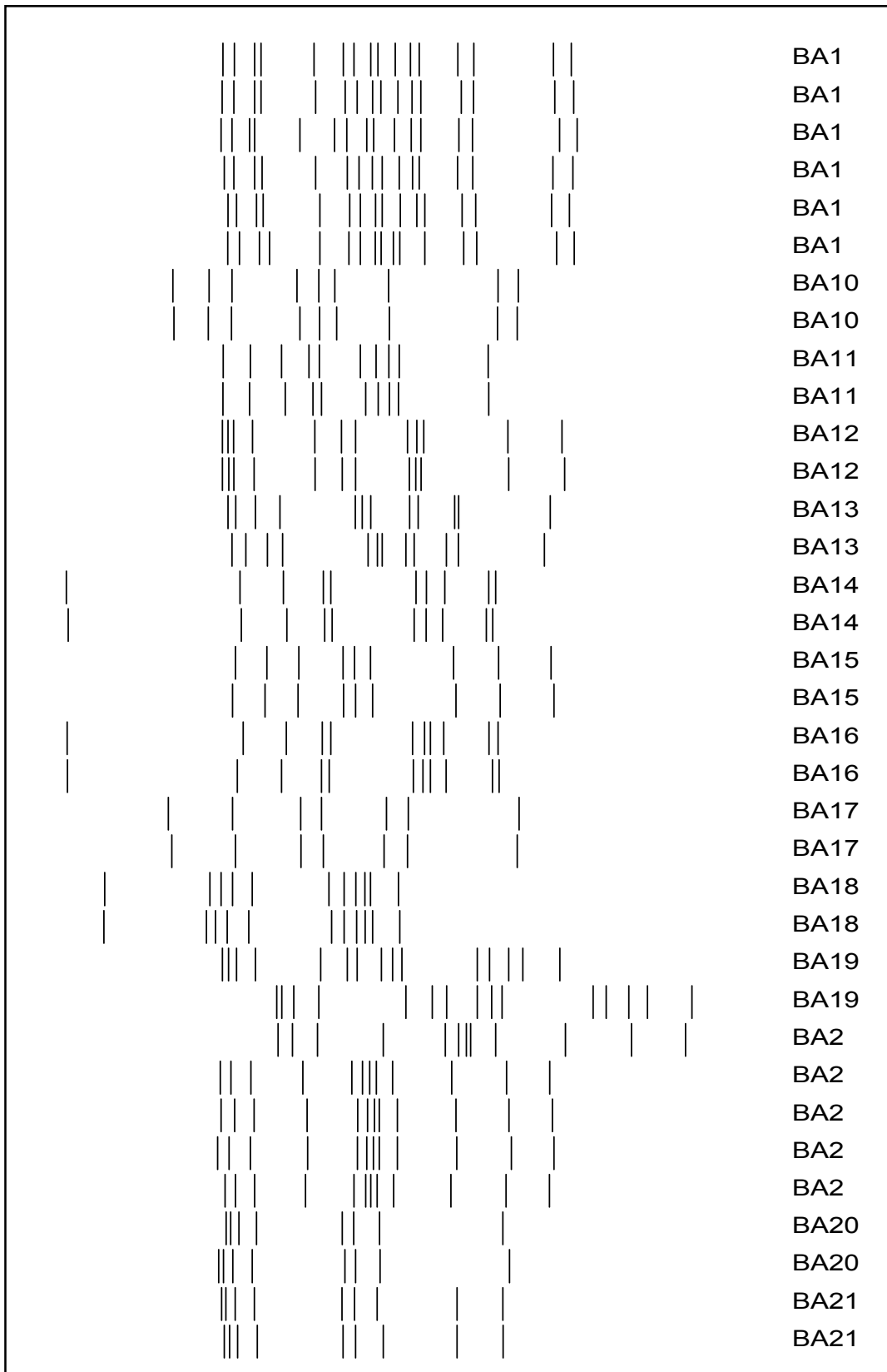


Figura 3: Padrão eletroforético dos isolados de *M.tuberculosis* e nomenclatura dos clusters

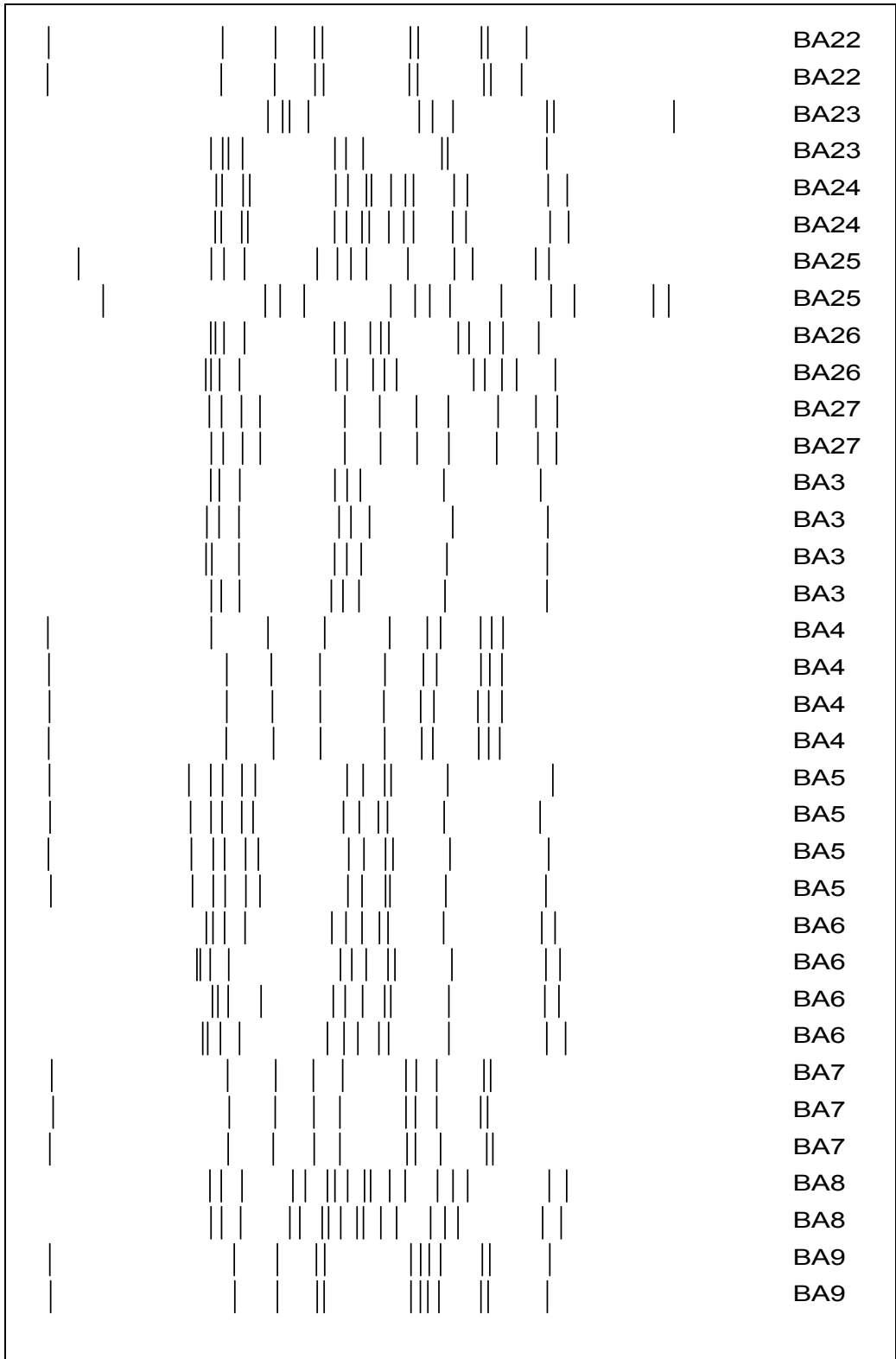


Figura 3: Padrão eletroforético dos isolados de *M.tuberculosis* e nomenclatura dos clusters (continuação)

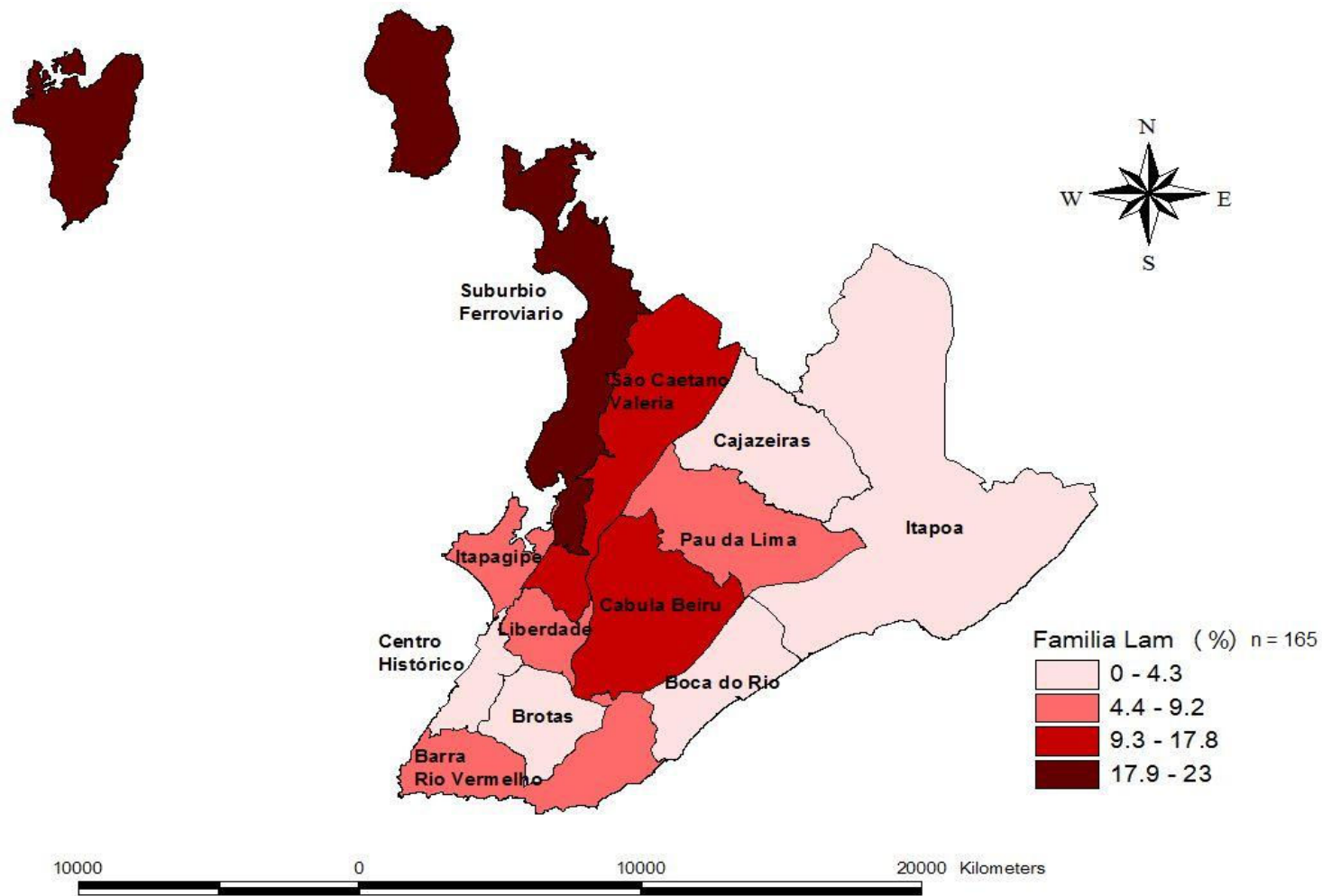


Figura 4: Proporção das famílias de *Mycobacterium tuberculosis* por Distrito Sanitário. Salvador, Bahia, agosto de 2008 a dezembro de 2009

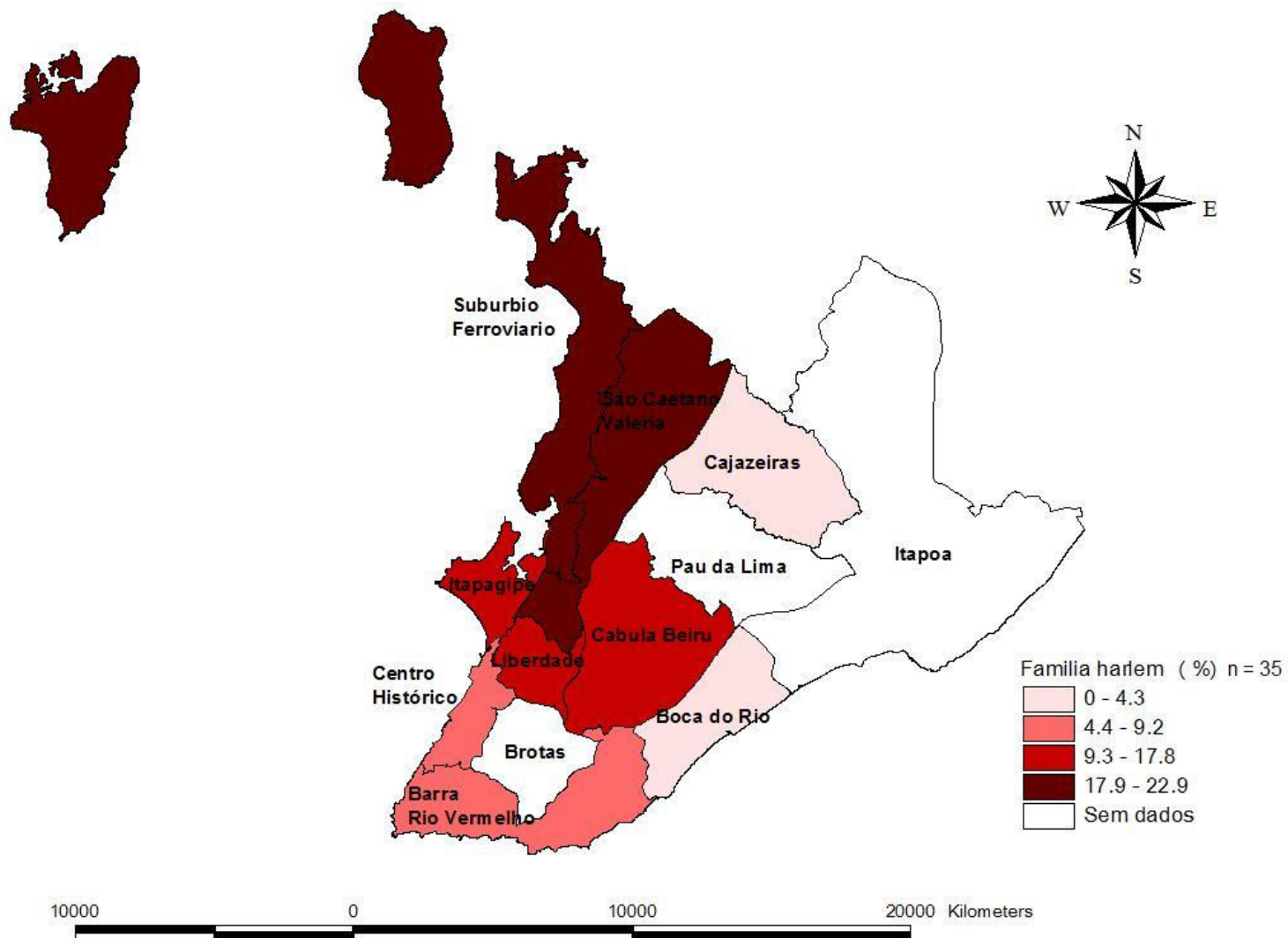


Figura 4: Proporção das famílias de *Mycobacterium tuberculosis* por Distrito Sanitário. Salvador, Bahia, agosto de 2008 a dezembro de 2009 (continuação)

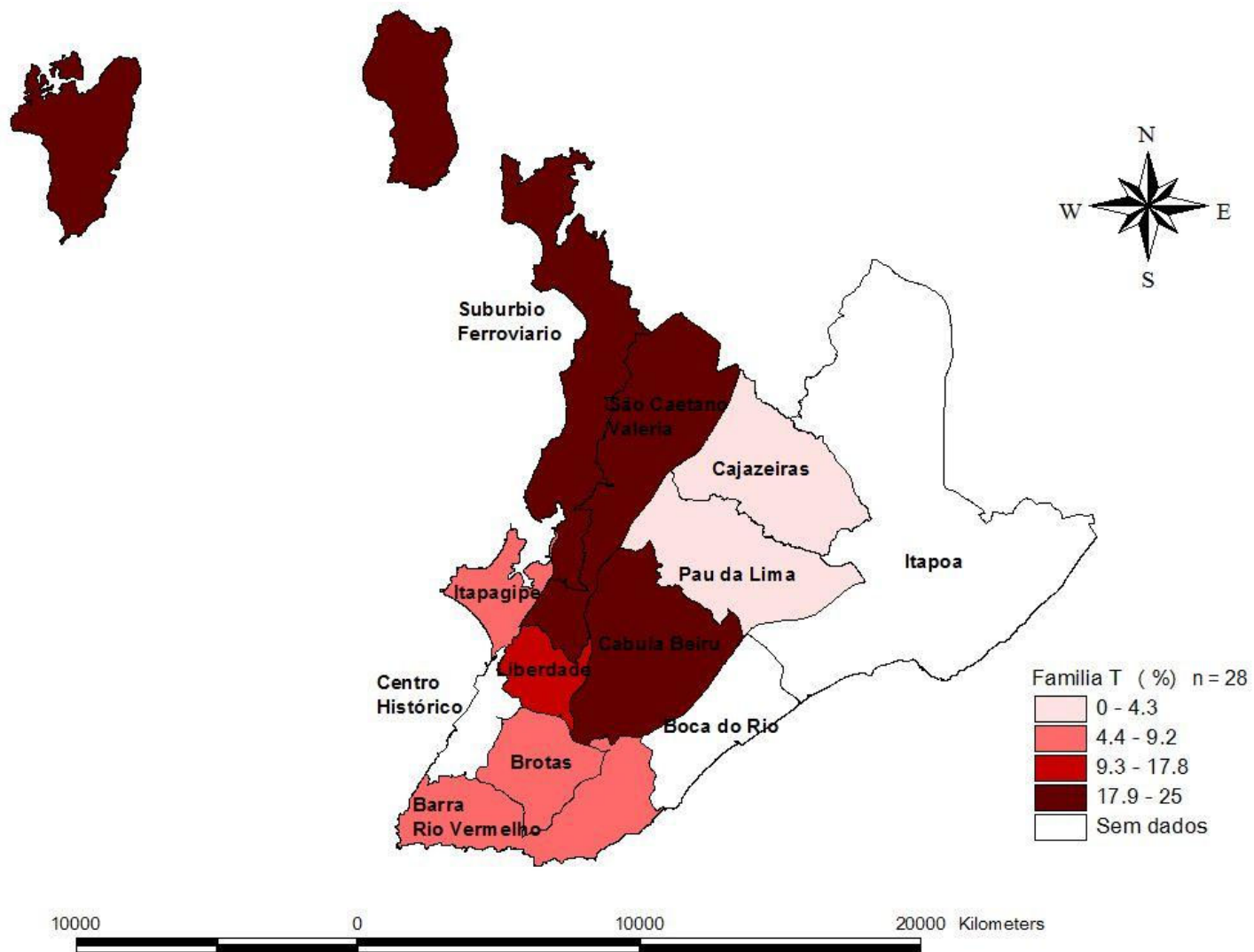


Figura 4: Proporção das famílias de *Mycobacterium tuberculosis* por Distrito Sanitário. Salvador, Bahia, agosto de 2008 a dezembro de 2009 (continuação)

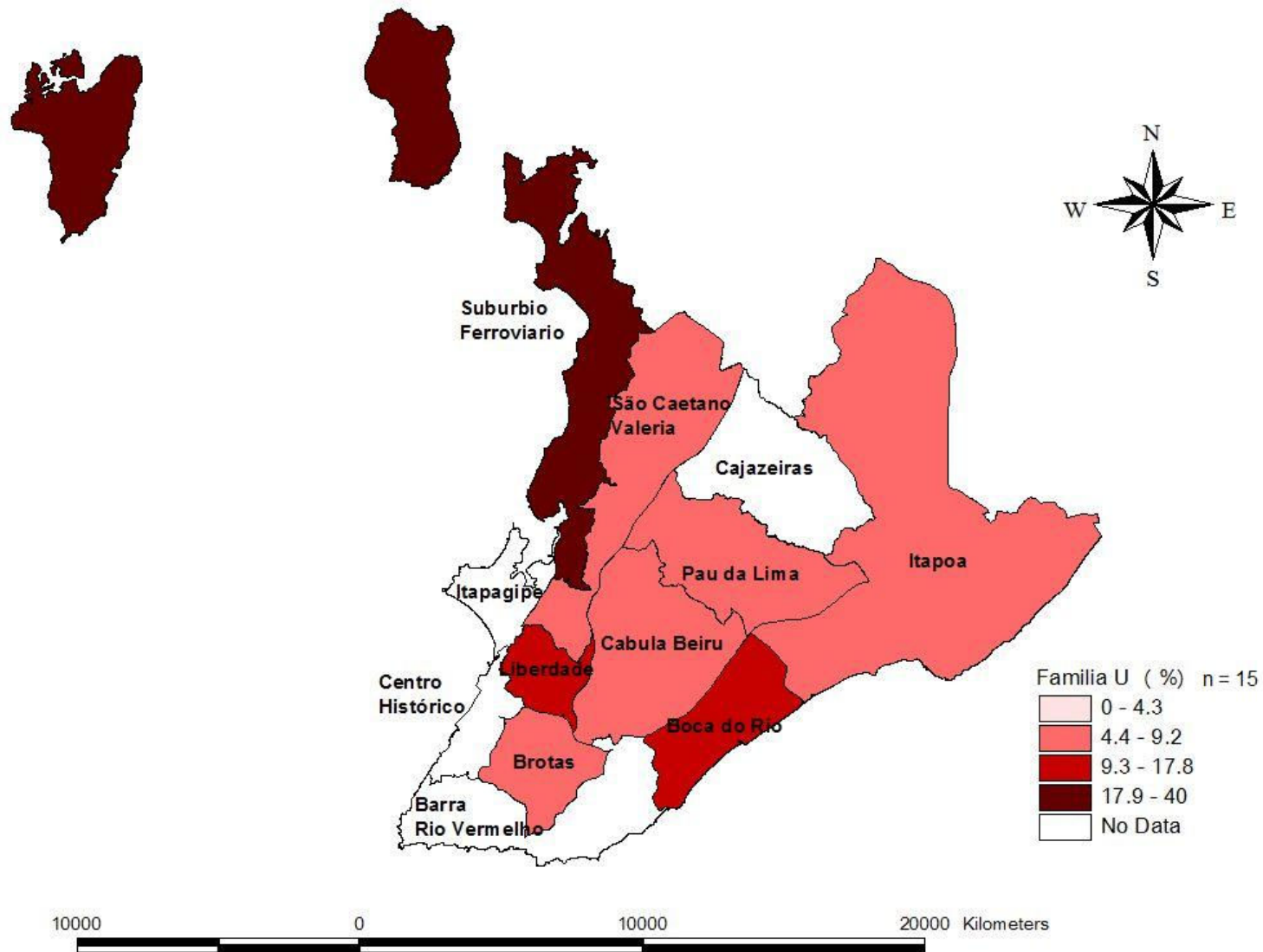


Figura 4: Proporção das famílias de *Mycobacterium tuberculosis* por Distrito Sanitário. Salvador, Bahia, agosto de 2008 a dezembro de 2009 (continuação)

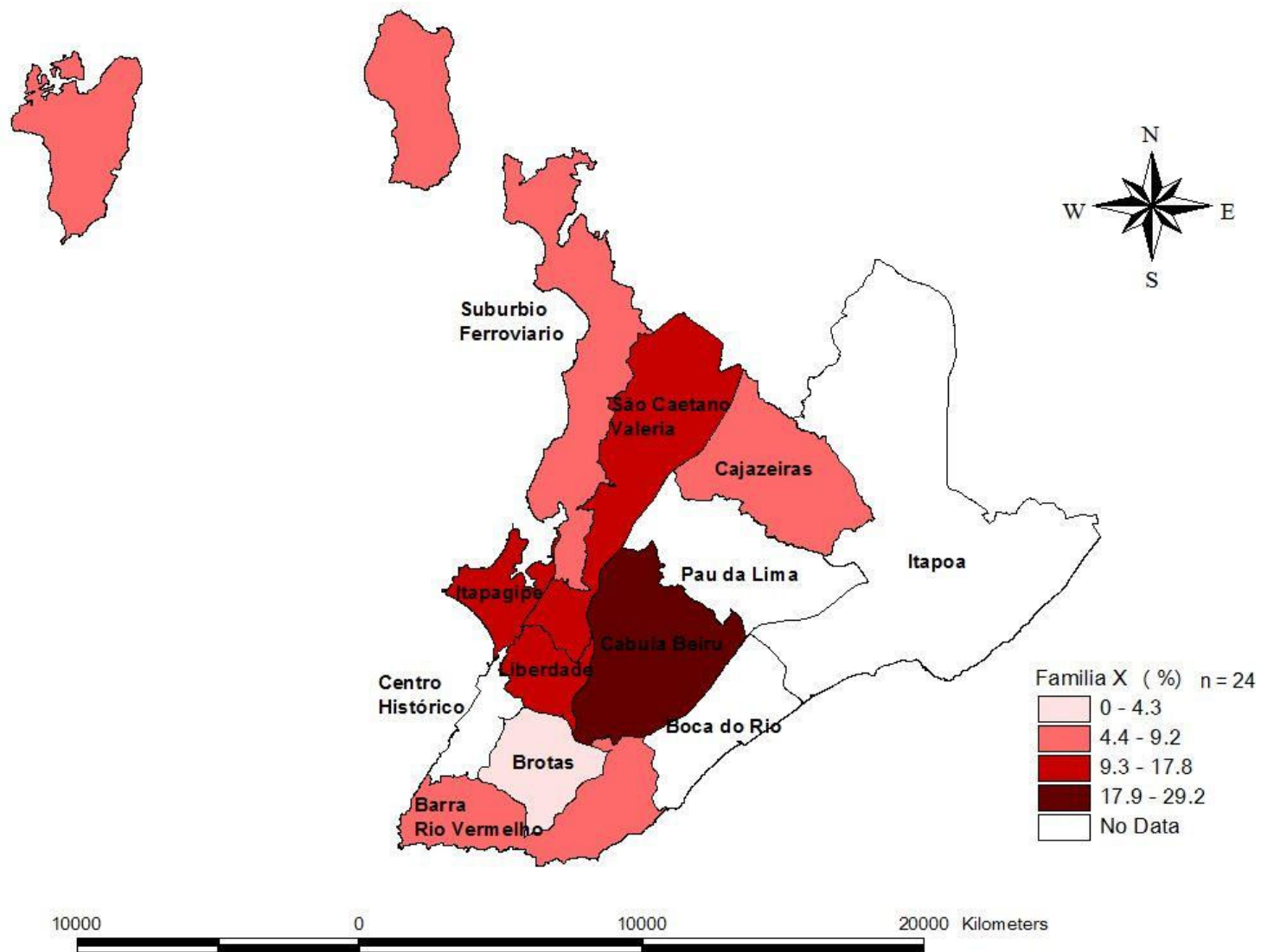


Figura 4: Proporção das famílias de *Mycobacterium tuberculosis* por Distrito Sanitário. Salvador, Bahia, agosto de 2008 a dezembro de 2009 (continuação)

ANEXO I

Tabela 1: Frequência e proporção das ocupações exercidas pelos casos com TB pulmonar. Salvador, Bahia, agosto de 2008 a dezembro de 2009

OCUPAÇÃO	n	%
Desempregado	51	18,61
Autônomo	22	8,03
Estudante	19	6,93
Aposentado	19	6,93
Pedreiro	18	6,57
Vendedor	13	4,74
Serviços gerais	7	2,55
Empregada Doméstica	7	2,55
Ambulante	7	2,55
Dona de casa	5	1,82
Diarista	5	1,82
Comerciante	5	1,82
Vigilante	3	1,09
Motorista	3	1,09
Cozinheira	3	1,09
Cabeleleiro	3	1,09
Auxiliar de escritório	3	1,09
Auxiliar administrativo	3	1,09
Atendente	3	1,09
Ajudante de pedreiro	3	1,09
Ajudante de cozinha	3	1,09
Servente	2	0,73
Segurança	2	0,73
Polidor	2	0,73
Pintor de automóvel	2	0,73
Pintor	2	0,73
Pescador	2	0,73
Pensionista	2	0,73
Operador de telemarketing	2	0,73
Manicure	2	0,73
Entregador	2	0,73
Babá	2	0,73
Zelador	1	0,36
“Trabalha em estacionamento”	1	0,36
Técnico em telefonia	1	0,36
Técnico em radiologia	1	0,36
Técnico em eletrônica	1	0,36
Serralheiro	1	0,36
Serigrafista	1	0,36
Segurança e <i>office - boy</i>	1	0,36
Representante comercial	1	0,36
Repositor de mercado	1	0,36
Promotor de vendas	1	0,36
Programador de computador	1	0,36
Professora	1	0,36
Porteiro	1	0,36
Padeiro	1	0,36

OCUPAÇÃO	n	%
Motociclista	1	0,36
Monitor de crianças	1	0,36
Mecânico industrial	1	0,36
Mecânico autônomo	1	0,36
“Marítimo” (marinheiro)	1	0,36
Lavador de carros	1	0,36
Lavadeira	1	0,36
Jardineiro	1	0,36
Guardador de carro	1	0,36
Garçonete	1	0,36
Funcionária pública	1	0,36
Feirante	1	0,36
Costureira	1	0,36
Chaveiro	1	0,36
Capoeirista e dançarino	1	0,36
Borracheiro	1	0,36
Bombeiro	1	0,36
Balconista	1	0,36
Auxiliar de serviços gerais	1	0,36
Auxiliar de peças	1	0,36
Auxiliar de eletricitista	1	0,36
Auxiliar de contabilidade	1	0,36
Assistente de atendimento	1	0,36
Artesão	1	0,36
Arrumador de cargas	1	0,36
Ajudante de restauração	1	0,36
Ajudante de montador	1	0,36
Ajudante de entrega	1	0,36
Ajudante de eletricitista	1	0,36
Ajudante de descarga	1	0,36
Agente de higienização	1	0,36
“Produção” (fábrica)	1	0,36
TOTAL	274	99,68

Tabela 2: Número e freqüência de casos por bairros de residência. Salvador, Bahia, agosto de 2008 a dezembro 2009

BAIRRO	n	%
Plataforma	19	5,83
São Caetano**	18	5,42
Paripe	14	4,29
Fazenda Grande	12	3,68
Periperi	11	3,37
Liberdade	10	3,07
Sussuarana	10	3,07
Tancredo Neves	9	2,76
Cajazeiras	8	2,45
Eng. Velho da Federação	7	2,15
Lobato	7	2,15
Pernambués	7	2,15
Pero Vaz	7	2,15
São Marcos	7	2,15
Uruguai	7	2,15
Engomadeira	6	1,84
Mata Escura	6	1,84
Pirajá	6	1,84
Caixa D'Água	5	1,53
IAPI	5	1,53
Narandiba	5	1,53
Rio Vermelho	5	1,53
Águas Claras	4	1,23
Arenoso	4	1,23
Brotas	4	1,23
Cabula	4	1,23
Cosme de Farias	4	1,23
Fazenda Coutos	4	1,23
Mirantes de Periperi	4	1,23
Pau da Lima	4	1,23
Rio Sena	4	1,23
São Cristovão	4	1,23
Boca do Rio	3	0,92
Caminho de Areia	3	0,92
Eng. Velho de Brotas	3	0,92
Federação	3	0,92
Itacaranha	3	0,92
São Gonçalo	3	0,92
Alto do Peru	2	0,61
Bairro da Paz	2	0,61
Barreiras	2	0,61
Boa Viagem	2	0,61
Boa Vista do Lobato	2	0,61
Bom Juá	2	0,61
Castelo Branco	2	0,61
Jardim Cruzeiro	2	0,61
Massaranduba	2	0,61
Mussurunga	2	0,61
Pituaçu	2	0,61
Ribeira	2	0,61
Santa Cruz	2	0,61
Saramandaia	2	0,61
Valéria	2	0,61
Vila Canária	2	0,61
Alto da Terezinha	1	0,31
Alto do Coqueirinho	1	0,31

BAIRRO	n	%
Arraial do Retiro	1	0,31
Barbalho	1	0,31
Bonfim	1	0,31
Calabetão	1	0,31
Calçada	1	0,31
Canabrava	1	0,31
CEASA	1	0,31
Centro	1	0,31
Comércio	1	0,31
Costa Azul	1	0,31
Curuzu	1	0,31
Don Avelar	1	0,31
Gamboá	1	0,31
Ilha de Maré	1	0,31
Ilha de São João	1	0,31
Jaqueira do Carneiro	1	0,31
Jardim Nova Esperança	1	0,31
Largo do Tanque	1	0,31
Luis Anselmo	1	0,31
Luis Tarquinio	1	0,31
Mares	1	0,31
Nazaré	1	0,31
Nordeste Amaralina	1	0,31
Nova Brasília	1	0,31
Ondina	1	0,31
Pau Miúdo	1	0,31
Pelourinho	1	0,31
Pituba	1	0,31
Praia Grande	1	0,31
San Martin	1	0,31
Santa Luzia do Lobato	1	0,31
Santa Mônica	1	0,31
São João do Cabrito	1	0,31
São Tomé de Paripe	1	0,31
Saúde	1	0,31
Sete de Abril	1	0,31
Sete Portas	1	0,31
Terezinha	1	0,31
Tororó	1	0,31
Vale das Pedrinhas	1	0,31
Vasco da Gama	1	0,31
Vila Laura	1	0,31
Vila Rui Barbosa	1	0,31

*n inclui residentes em Capelinha de São Caetano e Boa Vista de São Caetano

Tabela 5: Diversidade de padrões por RFLP obtidos nas subfamílias de *M. tuberculosis*. Salvador, Bahia, agosto de 2008 a dezembro de 2009

Subfamília	SIT	n isolados	n padrões RFLP	PU*	Clusters (n isolados nos clusters)
LAM					
LAM9	42	52	40	34	BA2 (5), BA3 (1), BA5 (4), BA6 (4), BA13 (1), BA23 (2)
LAM3	33	26	20	18	BA1(5), BA8 (2)
LAM6	64	18	16	13	BA20 (1), BA26 (2), BA19(2)
LAM4	828	12	10	8	BA3 (3), BA13 (1)
LAM2	17	9	8	7	BA18 (2)
LAM4	60	8	7	6	BA15 (2)
LAM1	20	8	8	8	
LAM5	176	6	6	6	
LAM3 e S /CONVERGENT	4	5	3	1	BA10 (2), BA17 (2)
LAM5	93	4	3	2	BA25 (2)
LAM6	95	4	4	4	
LAM9	163	2	2	2	
LAM9	177	2	2	2	
LAM2	179	1	1	1	
LAM11_ZWE	59	1	1	1	
LAM3	130	1	1		BA1(1)
LAM9	388	1	1	1	
LAM9	435	1	1	1	
LAM9	440	1	1	1	
LAM1-LAM4	1321	1	1	1	
LAM9	1337	1	1	1	
X1-LAM9	1470	1	1	1	
LAM6	1768	1	1	1	
HAARLEM					
H3	50	23	18	14	BA4 (4), BA9 (2), BA14 (1), BA16 (2)
H1	47	7	5	4	BA7(3)
H2	2	1	1	1	
H3	3	1	1	1	
H3	335	1	1	1	
H1	382	1	1	1	
H3	748	1	1	1	
T					
T1	53	5	5	5	
T5_MAD2	58	3	2	1	BA11(2)
T1	378	3	3	3	
T1	51	2	2	2	
T3	157	2	2	2	
T2	317	2	2	2	
T2	392	2	2	2	
T1 (T4-CE1 ANCESTOR?)	65	1	1	1	
T2-T3	73	1	1	1	
T1	306	1	1	1	

Subfamília	SIT	n isolados	n padrões RFLP	PU*	Clusters (n isolados nos clusters)
T1	373	1	1	1	
T1	453	1	1	1	
T2-S	784	1	1	1	
T1_RUS2	1103	1	1	1	
T1	1166	1	1	1	
T2	1355	1	1	1	
U					
U	238	5	4	3	BA22 (2)
U	402	3	3	3	
U	161	2	2	2	
U	534	2	2	2	
U	834	1	1	1	
U	863	1	1	1	
U	1758	1	1	1	
X					
X3	92	5	1		
X2	439	5	1		
X1	449	5	2	1	Isolados com < = 5 cópias <i>IS6110</i>
X2	137	4	4		
X1	119	3	1		
X3	91	1	1	1	

*PU – perfil único; cepa não cluster

Quadro 1: Frequência e proporção de casos novos de tuberculose* notificados por unidades de captação e que foram incluídos do estudo, com respectivos distritos sanitários. Salvador, Bahia, 2005.

UNIDADE DE SAÚDE	DISTRITO SANITÁRIO	CASOS NOTIFICADOS (n / %)	CASOS INCLUÍDOS (n / %) (2009 / 2010)
HEOM	4º DS Liberdade	1364 / 38,9	164 / 50,3
IBIT	6º DS Barra/Rio Vermelho	374 / 10,6	54 / 16,6
2º Centro Ramiro de Azevedo	1º DS Centro Histórico	358 / 10,2	8 / 2,5
6º Centro Rodrigo Argolo	9º DS Cabula/Beiru	158 / 4,5	24 / 7,4
Centro Adroaldo Albergaria	11º DS Subúrbio Ferroviário	100 / 2,8	31 / 9,5
3º Centro Profº Bezerra Lopes	4º DS Liberdade	147 / 4,2	2 / 0,6
Hospital Santo Antônio	2º DS Itapagipe	124 / 3,5	35 / 10,7
13º Centro Eduardo Mamede	8º DS Mussurunga	47 / 1,3	1 / 0,3
TOTAL		2672 / 76,2	326/100

*Tuberculose pulmonar e extrapulmonar

Quadro 2: Características dos casos pertencentes aos *clusters*. Salvador, Bahia, agosto de 2008 a dezembro de 2009

Variável Cluster (n = 70)	BA1 (n = 6)	BA2 (n = 5)	BA3 (n = 4)	BA4 (n = 4)	BA5 (n = 4)
Mês/ano da coleta	Fev/Abr/Mai/Ago/Set/Out 2009	Ago/Set/Nov 2008 e Abr 2009	Out/Nov 2008 e Mai/Set 2009	Out/Dez 2008 e Mai/Out 2009	Fev/Mar/Abr/Ago 2009
Sexo	3 Masc / 3 Fem	3 Masc / 2 Fem	1 Masc / 3 Fem	2 Masc / 2 Fem	3 Masc / 1 Fem
Idade Média (variação)	41,3 (20 – 74)	33,4 (23 – 52)	48,7 (39-53)	50,5 (23 – 66)	33,2 (18-53)
Naturalidade ¹	1 Catule / 1 Jaguaquara / 1 Sto. Antonio de Jesus / 1 Serra Preta / 2 Salvador	1 Muritiba / 4 Salvador	1 Miranga / 1 Floresta Azul / 1 São Sebastião do Passé / 1 Catuense	4 Salvador	1 Santo Amaro / 1 Itaparica / 2 Salvador
Bairro de Residência	1 Arenoso / 1 Calabetão / 1 Narandiba / 1 Pirajá / 1 Pituacú / 1 Sete Portas	2 Engomadeira / 1 São Gonçalo / 1 Periperi / 1 Lobato	1 Paripe / 1 Plataforma / 1 Rio Sena / 1 São Marcos	1 Águas Claras / 1 Alto da Terezinha / 1 Arraial do Retiro / 1 Boca do Rio	1 Arenoso / 1 IAPI / 1 Saramandaia / 1 Saúde
Estado Civil	3 Solteiro / 1 Casado / 1 Viúvo / 1 "Outros" não especificado	5 Solteiro	2 Solteiro / 2 Casado	1 Solteiro / 1 Divorciado / 2 Viúvo	1 Solteiro / 3 Casado
Escolaridade ²	2 Analfabeto / 2 1º grau / 2 2º grau	1 Analfabeto / 2 1º grau / 1 2º grau / 1 Superior Incompleto	4 1º grau	2 Analfabeto / 1 1º grau / 1 2º grau	2 Analfabeto / 1 1º grau / 1 2º grau
Drogas	6 Não	5 Não	4 Não	4 Não	1 Sim / 3 Não
História de contato	2 Sim / 4 Não	3 Sim / 2 Não	2 Não / 2 Não sabe	2 Não / 2 Não sabe	1 Sim / 1 Não / 2 Não sabe
Baciloscopia	2 + / 2 ++ / 2 +++	3 + / 1 ++ / 1 +++	1 + / 1 ++ / 1 +++ / 1 Desconhecido	1 + / 3 +++	3 ++ / 1 +++
BCG	5 Sim / 1 Não	4 Sim / 1 Não	3 Sim / 1 Não	3 Sim / 1 Não	3 Sim / 1 Não
HIV	1 Negativo / 5 Não realizado	3 Negativo / 2 Não realizado	2 Negativo / 2 Não realizado	4 Não realizado	4 Não realizado
Raça/Cor	1 Branca / 4 Parda / 1 Preta	1 Branca / 3 Parda / 1 Preta	1 Branca / 3 Parda	1 Branca / 2 Parda / 1 Preta	2 Parda / 2 Preta
Prisão/Rua/Albergue	6 Não se aplica	1 Rua / 4 Não se aplica	4 Não se aplica	4 Não se aplica	1 Albergue / 3 Não se aplica
Ocupação	1 Empregada Doméstica 2 Estudantes 2 Aposentados 1 Não informado	1 Professora 1 Promotor de vendas 1 Autônomo 1 Vendedor 1 Não informado	2 Autônomos 1 Cozinheira 1 Desempregado	1 Porteiro 1 Pensionista 1 Aposentado 1 Desempregado	1 Vendedor 1 Vendedor ambulante 1 Serviços Gerais 1 Não informado

¹ Todas as cidades mencionadas são do Estado da Bahia ² 1º e 2º grau incompleto ou completo

Quadro 2: Características dos casos pertencentes aos *clusters*. Salvador, Bahia, agosto de 2008 a dezembro de 2009 (continuação)

Variável Cluster (n = 70)	BA6 (n = 4)	BA7 (n = 3)	BA8 (n = 2)	BA9 (n = 2)	BA10 (n = 2)
Mês/ano da coleta	Out 2008 e Jul/Out 2009	Mai/Abr/Set 2009	Set/2008 e Set/2009	Abr/Mai 2009	Jan/Ago 2009
Sexo	1 Masc / 3 Fem	3 Fem	2 Masc	1 Masc / 1 Fem	2 Fem
Idade Média (variação)	33,5 (22 – 51)	33,5 (22 – 51)	35 (27 – 43)	40 (29 – 51)	22,5 (16 - 29)
Naturalidade ¹	1 Itamarí / 3 Salvador	1 Itacaré / 2 Salvador	2 Salvador	1 Santo Amaro / 1 Salvador	1 Nazaré das Farinhas/ 1 Salvador
Bairro de Residência	1 Lobato / 1 Pau da Lima / 1 Pelourinho / 1 Tancredo Neves	1 Fazenda Grande / 2 São Caetano	1 Boa Viagem / 1 Uruguai	1 Federação / 1 São Gonçalo do Retiro	1 Cabula / 1 Cajazeiras
Estado Civil	2 Solteiro / 1 Casado / 1 Divorciado	3 Casado	2 Solteiro	1 Casado / 1 Viúvo	2 Solteiro
Escolaridade ²	2 Analfabeto / 2 1º grau	2 Analfabeto / 1 1º grau	1 1º grau / 1 2º grau	1 2º grau / 1 “Outros” não especificado	1 2º grau / 1 Analfabeto
Drogas	4 Não	3 Não	2 Não	1 Sim / 1 Não	2 Não
História de contato	1 Sim / 3 Não	2 Sim / 1 Não	2 Não	1 Sim / 1 Não	1 Sim / 1 Não sabe
Baciloscopia	2 ++ / 2 +++	1 + / 1 ++ / 1 +++	2 +	1 + / 1 +++	1 ++ / 1 +++
BCG	2 Sim / 2 Não	2 Sim / 1 Não	2 Sim	1 Sim / 1 Não	2 Sim
HIV	2 Negativo / 2 Não realizado	3 Não realizado	1 Negativo / 1 Não realizado	1 Negativo / 1 Não realizado	2 Não realizado
Raça/Cor	3 Parda / 1 Preta	1 Branca / 3 Parda	2 Branca	1 Parda / 1 Amarela	2 Parda
Prisão/Rua/Albergue	1 Rua / 3 Não se aplica	3 Não se aplica	2 Não se aplica	1 Prisão / 1 Não se aplica	2 Não se aplica
Ocupação	2 Serviços Gerais 1 Estudantes 1 Vendedor Ambulante	1 Trabalha em estacionamento 1 Dona de casa 1 Não Informado	1 Auxiliar Administrativo 1 Autônomo	1 Vendedor Autônomo 1 Desempregada	1 Estudante 1 Dona de casa

Quadro 2: Características dos casos pertencentes aos clusters. Salvador, Bahia, agosto de 2008 a dezembro de 2009 (continuação)

Variável <i>Cluster</i> (n = 70)	BA11 (n = 2)	BA12 (n = 2)	BA13 (n = 2)	BA14 (n = 2)	BA15 (n = 2)
Mês/ano da coleta	Mai/Julho 2009	Mai/Julho 2009	Out 2008 e Março 2009	Fev/Abril 2009	Nov 2008 e Fev 2009
Sexo	1 Masc / 1 Fem	1 Masc / 1 Fem	2 Masc	2 Masc	1 Masc / 1 Fem
Idade Média (variação)	39,5 (33 – 46)	24,5 (24 – 25)	54,5 (50 – 59)	52,5 (43 – 62)	32 (21 – 43)
Naturalidade ¹	1 Teolândia / 1 Salvador	2 Salvador	2 Salvador	1 Itapé / 1 Salvador	2 Salvador
Bairro de Residência	1 Castelo Branco / 1 Paripe	1 Mata Escura / 1 Sussuarana	1 Lobato / 1 Periperi	1 Nova Brasília / 1 Paripe	1 Faz. Coutos / 1 Plataforma
Estado Civil	2 Casado	1 Solteiro / 1 Casado	1 Solteiro / 1 Casado	1 Casado / 1 Divorciado	2 Solteiro
Escolaridade ²	2 1º grau	2 2º grau	1 1º grau / 2º grau	1 Analfabeto / 1 2º grau	2 2º grau
Drogas	2 Não	2 Não	2 Não	2 Não	2 Não
História de contato	2 Não	2 Não	2 Não	2 Não	1 Sim / 1 Não
Baciloscopia	1 + / 1 ++	2 +	2 ++	1 ++ / 1 +++	2 ++
BCG	1 Sim / 1 Não	1 Sim / 1 Não	1 Sim / 1 Não	2 Sim	2 Sim
HIV	1 Negativo / 1 Não realizado	2 Não realizado	2 Não realizado	1 Negativo / 1 Não realizado	1 Negativo / 1 Não realizado
Raça/Cor	1 Parda / 1 Amarela	2 Preta	2 Parda	1 Parda / 1 Preta	1 Parda / 1 Preta
Prisão/Rua/Albergue	2 Não se aplica	2 Não se aplica	2 Não se aplica	2 Não se aplica	2 Não se aplica
Ocupação	1 Diarista 1 Desempregada	1 Vendedora 1 Desempregado	1 Pedreiro 1 Autônomo	1 Vigilante 1 Borracheiro	1 Assistente de Atendimento 1 Não Informado

Quadro 2: Características dos casos pertencentes aos *clusters*. Salvador, Bahia, agosto de 2008 a dezembro de 2009 (continuação)

Variável Cluster (n = 70)	BA16 (n = 2)	BA17 (n = 2)	BA18 (n = 2)	BA19 (n = 2) ** Informações obtidas da ficha de notificação do SINAN	BA20 (n = 2)
Mês/ano da coleta	Abr/Julho 2009	Agos 2008 e Março 2009	Mai/Setembro 2009	Dez 2008 e Jan 2009	Março/Agosto 2009
Sexo	2 Fem	2 Masc	2 Masc	2 Masc	2 Fem
Idade Média (variação)	29,5 (28 – 31)	35,5 (23 – 48)	40,5 (33 – 48)	34,5 (30 – 39)	30 (27 – 33)
Naturalidade ¹	1 Senhor do Bonfim / 1 Salvador	2 Salvador	1 Olindina / 1 Salvador	-	2 Salvador
Bairro de Residência	1 Faz. Coutos / 1 Pirajá	2 Uruguai	1 Rio Vermelho / 1 Tancredo Neves	1 Curuzu (Liberdade) / 1 Estrada das Barreiras (Cabula)	1 Sussuarana / 1 Lobato
Estado Civil	1 Solteiro / 1 Casado	2 Solteiro	1 Solteiro / 1 Casado	-	2 Casado
Escolaridade ²	1 1° grau / 1 2° grau	1 Analfabeto / 1 2° grau	1 1° grau / 1 2° grau	1 2° grau / 1 Não informado	1 1° grau / 1 2° grau
Drogas	1 Sim / 1 Não	2 Não	2 Não	-	2 Não
História de contato	1 Sim / 1 Não	1 Sim / 1 Não sabe	1 Sim / 1 Não	2 Não sabe	2 Não
Baciloscopia	2 ++	1 + / 1 ++	1 + / 1 ++	-	1 +++ / 1 ++
BCG	2 Sim	2 Sim	1 Sim / 1 Não	-	1 Não / 1 Sim
HIV	1 Negativo / 1 Não realizado	1 Negativo / 1 Não realizado	1 Negativo / 1 Não realizado	2 Não realizado	2 Negativo
Raça/Cor	1 Parda / 1 Preta	2 Parda	1 Parda / 1 Preta	2 Parda	1 Parda / 1 Preta
Prisão/Rua/Albergue	2 Não se aplica	1 Prisão / 1 Não se aplica	1 Rua / 1 Não se aplica	-	1 Albergue / 1 Não se aplica
Ocupação	1 Desempregada 1 Garçonete	1 Pedreiro/Pintor 1 Não Informado	1 Motorista 1 Não Informado	-	1 Vendedora 1 Cozinheira

Quadro 2: Características dos casos pertencentes aos *clusters*. Salvador, Bahia, agosto de 2008 a dezembro de 2009 (continuação)

Variável Cluster (n = 70)	BA21 (n = 2)	BA22 (n = 2)	BA23 (n = 2)	BA24 (n = 2)	BA25 (n = 2)
Mês/ano da coleta	Agosto 2009	Out 2008 / Fev 2009	Out 2008	Março / Abril 2009	Jan / Nov 2009
Sexo	2 Masc	2 Masc	1 Masc / 1 Fem	2 Masc	2 Masc
Idade Média (variação)	45 (41 – 49)	42 (35 – 49)	26,5 (22 – 31)	31,5 (18 – 45)	31,5 (22 – 41)
Naturalidade ¹	2 Salvador	1 Camamu / 1 São Sebastião do Passé	2 Salvador	1 Itabuna/ 1 Salinas	1 Salvador / 1 Sem informação
Bairro de Residência	1 Itacaranha / 1 Periperi	1 Ilha de Maré / 1 Periperi	1 Plataforma / 1 Cajazeiras	1 Periperi / 1 Brotas	1 São Marcos / 1 Sussuarana
Estado Civil	1 Solteiro / 1 Casado	2 Solteiro	1 Solteiro / 1 Casado	1 Casado / 1 Solteiro	1 Solteiro / 1 Sem Informação
Escolaridade ²	2 1° grau	1 Analfabeto / 1 1° grau	1 1° grau / 1 2° grau	1 Analfabeto / 1 1° grau	1 Analfabeto / 1 1° grau
Drogas	2 Não	2 Não	2 Não	2 Não	1 Não / 1 Sem informação
História de contato	2 Não	2 Não	1 Sim / 1 Não	2 Não	1 Não / 1 Não sabe
Baciloscopia	2 ++	2 +++	1 ++/ 1 +++	2 +++	1 ++ /1 Sem informação
BCG	2 Sim	2 Sim	2 Sim	2 Sim	1 Sim / 1 Sem informação
HIV	2 Não realizado	2 Não realizado	1 Negativo / 1 Não realizado	1 Negativo / 1 Não realizado	2 Não realizado
Raça/Cor	2 Parda	1 Parda / 1 Preta	2 Parda	2 Parda	1 Parda / 1 Preta
Prisão/Rua/Albergue	2 Não se aplica	2 Não se aplica	2 Não se aplica	1 Albergue / 1 Não se aplica	1 Não se aplica / 1 Sem informação
Ocupação	1 Vendedor Autônomo 1 Autônomo	1 Pedreiro 1 Pescador	1 Empregada Doméstica 1 Ajudante de Entrega	1 Autônomo 1 Não Informado	1 Padeiro 1 Sem Informação

Quadro 2: Características dos casos pertencentes aos *clusters*. Salvador, Bahia, agosto de 2008 a dezembro de 2009 (continuação)

Variável Cluster (n = 70)	BA26 (n = 2)	BA27 (n = 2)
Mês/ano da coleta	Maio / Set 2009	Agosto 2009
Sexo	1 Masc / 1 Fem	1 Masc / 1 Fem
Idade Média (variação)	28 (25 – 31)	26,5 (22 – 31)
Naturalidade ¹	1 Nazaré das Farinhas/ 1 Salvador	1 Salvador / 1 Sem informação
Bairro de Residência	1 Terezinha / 1 Bom Juá	1 Plataforma / 1 Tancredo Neves
Estado Civil	2 Solteiro	1 Solteiro / 1 Sem informação
Escolaridade ²	1 Analfabeto / 1 2º grau	2 1º grau
Drogas	2 Não	1 Não
História de contato	2 Sim	2 Não sabe
Baciloscopia	1 ++ / 1 +++	1 ++ / 1 Sem informação
BCG	1 Sim / 1 Não	1 Sim / 1 Sem informação
HIV	1 Negativo / 1 Não realizado	1 Negativo / 1 Não realizado
Raça/Cor	1 Branca / 1 Parda	1 Parda / 1 Preta
Prisão/Rua/Albergue	2 Não se aplica	1 Não se aplica / 1 Sem informação
Ocupação	1 Comerciante 1 Serviços Gerais	1 Desempregada 1 Sem informação

ANEXO II: FICHA DE NOTIFICAÇÃO DO SINAN

República Federativa do Brasil Ministério da Saúde		SINAN SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO FICHA DE NOTIFICAÇÃO / INVESTIGAÇÃO TUBERCULOSE		Nº	
TUBERCULOSE PULMONAR: Paciente com tosse com expectoração por três ou mais semanas, febre, perda de peso e apetite, com confirmação bacteriológica por baciloscopia direta e/ou cultura e/ou com imagem radiológica sugestiva de tuberculose. TUBERCULOSE EXTRAPULMONAR: Paciente com evidências clínicas, achados laboratoriais, inclusive histopatológicos, compatíveis com tuberculose extrapulmonar ativa, ou pacientes com pelo menos uma cultura positiva para <i>M. tuberculosis</i> de material proveniente de localização extrapulmonar.					
Dados Gerais	1 Tipo de Notificação 2 - Individual		3 Data da Notificação		
	2 Agravado/doença TUBERCULOSE		Código (CID10) A 1 6 . 9		
	4 UF	5 Município de Notificação		Código (IBGE)	
	6 Unidade de Saúde (ou outra fonte notificadora)		Código	7 Data do Diagnóstico	
Notificação Individual	8 Nome do Paciente		9 Data de Nascimento		
	10 (ou) Idade 1 - Hora 2 - Dia 3 - Mês 4 - Ano	11 Sexo M - Masculino F - Feminino I - Ignorado	12 Gestante 1-1º Trimestre 2-2º Trimestre 3-3º Trimestre 4- Idade gestacional Ignorada 5-Não 6- Não se aplica 9-Ignorado	13 Raça/Cor 1-Branca 2-Preta 3-Amarela 4-Parda 5-Indígena 9- Ignorado	
	14 Escolaridade 0-Analfabeto 1-1ª a 4ª série incompleta do EF (antigo primário ou 1º grau) 2-4ª série completa do EF (antigo primário ou 1º grau) 3-5ª a 8ª série incompleta do EF (antigo ginásio ou 1º grau) 4-Ensino fundamental completo (antigo ginásio ou 1º grau) 5-Ensino médio incompleto (antigo colegial ou 2º grau) 6-Ensino médio completo (antigo colegial ou 2º grau) 7-Educação superior incompleta 8-Educação superior completa 9-Ignorado 10- Não se aplica				
	15 Número do Cartão SUS		16 Nome da mãe		
Dados de Residência	17 UF	18 Município de Residência		Código (IBGE)	
	19 Distrito		20 Bairro		
	21 Logradouro (rua, avenida,...)		22 Número		
	23 Complemento (apto., casa, ...)		24 Geo campo 1		
	25 Geo campo 2		26 Ponto de Referência		
	27 CEP		28 (DDD) Telefone		
29 Zona 1 - Urbana 2 - Rural 3 - Periurbana 9 - Ignorado		30 País (se residente fora do Brasil)			
Dados Complementares do Caso					
Antecedentes Epidemiológicos	31 Nº do Prontuário		32 Ocupação		
	33 Tipo de Entrada 1 - Caso Novo 2 - Recidiva 3 - Reingresso Após Abandono 4 - Não Sabe 5 - Transferência		34 Institucionalizado 1 - Não 2 - Presídio 3 - Asilo 4 - Orfanato 5 - Hospital Psiquiátrico 6 - Outro 9 - Ignorado		
Dados Clínicos	35 Raio X do Tórax 1 - Suspeito 2 - Normal 3 - Outra Patologia 4 - Não Realizado		36 Teste Tuberculínico 1 - Não Reator 2 - Reator Fraco 3 - Reator Forte 4 - Não Realizado		
	37 Forma 1 - Pulmonar 2 - Extrapulmonar 3 - Pulmonar + Extrapulmonar		38 Se Extrapulmonar 1 - Pleural 2 - Gang. Perif. 3 - Geniturinária 4 - Óssea 5 - Ocular 6 - Miliar 7 - Meningoencefálico 8 - Cutânea 9 - Laringea 10 - Outra		
Dados do Laboratório	39 Agravos Associados 1 - Sim 2 - Não 9 - Ignorado Aids Alcoolismo Diabetes Doença Mental Outras				
	40 Baciloscopia de Escarro (diagnóstico) 1ª amostra 1 - Positiva 2 - Negativa 2ª amostra 3 - Não Realizada		41 Baciloscopia de Outro Material 1 - Positiva 2 - Negativa 3 - Não Realizada		
	42 Cultura de Escarro 1 - Positiva 3 - Em Andamento 2 - Negativa 4 - Não Realizada		43 Cultura de Outro Material 1 - Positiva 3 - Em Andamento 2 - Negativa 4 - Não Realizada		
	44 HIV 1 - Positivo 3 - Em Andamento 2 - Negativo 4 - Não Realizado		45 Histopatologia 1 - Baar Positivo 4 - Em Andamento 2 - Sugestivo de TB 5 - Não Realizado 3 - Não Sugestivo de TB		
Tratamento	46 Data de Início do Tratamento Atual		47 Drogas 1 - Sim 2 - Não Rifampicina Isoniazida Pirazinamida Etionamida Etambutol Estreptomicona Outras		
	48 Indicado para Tratamento Supervisionado (TS/DOTS)? 1 - Sim 2 - Não 9 - Ignorado		49 Número de Contatos Registrados		50 Doença Relacionada ao Trabalho 1 - Sim 2 - Não 9 - Ignorado
Investigador	Município/Unidade de Saúde			Cód. da Unid. de Saúde	
	Nome		Função	Assinatura	
Tuberculose		Sinan NET		SVS 18/05/2006	

ANEXO III

PROJETO DE PESQUISA



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE SAÚDE COLETIVA-ISC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE COLETIVA**

JOILDA SILVA NERY

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DA TUBERCULOSE EM
SALVADOR (BA)**

Salvador
2010

JOILDA SILVA NERY

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DA TUBERCULOSE EM
SALVADOR (BA)**

Projeto apresentado ao Programa de Pós -
graduação em Saúde Coletiva, Instituto de
Saúde Coletiva - ISC, Universidade Federal da
Bahia, como requisito no Exame de
Qualificação (ISC 794)

Orientador (a): Prof^a. Susan Martins Pereira
Co-orientador (a): Prof^a Theolis Barbosa

Salvador
2010

JOILDA SILVA NERY

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DA TUBERCULOSE EM
SALVADOR (BA)**

Banca examinadora:

Prof^a Susan Martins Pereira - Orientadora
Instituto de Saúde Coletiva (ISC) - Universidade Federal da Bahia (UFBA)

Prof^a Theolis Barbosa Bessa
Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz – FIOCRUZ/BA

Prof^o Guilherme de Sousa Ribeiro
Instituto de Saúde Coletiva (ISC) - Universidade Federal da Bahia (UFBA)

Prof^a Joice Neves Reis Pedreira
Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz – FIOCRUZ/BA

Salvador
2010

SUMÁRIO

RESUMO	92
1. INTRODUÇÃO	93
1.1 Epidemiologia da doença.....	93
1.2 Etiologia.....	95
1.3 Transmissão e Patogênese.....	97
1.4 Genoma e diferenciação de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	99
1.5 Aplicação da genotipagem na epidemiologia da tuberculose.....	101
2. JUSTIFICATIVA	110
3. PERGUNTA DE INVESTIGAÇÃO	110
4. OBJETIVOS	111
4.1 Geral	111
4.2 Específicos	111
5. METODOLOGIA	112
5.1. Desenho do Estudo.....	112
5.2. População de Estudo.....	112
5.3 Coleta de dados	113
5.4 Coleta de amostras clínicas.....	114
5.5 Instrumentos de Pesquisa.....	115
5.6 Critérios de Inclusão.....	115
5.7 Critérios de Exclusão.....	115
5.8 Isolamento de cepas de <i>M. tuberculosis</i>	116
5.9 Caracterização de <i>M.tuberculosis</i> pelo método RFLP <i>IS6110</i>	116
5.10 Análise do perfil genético das cepas.....	117
6. PLANO DE ANÁLISE	118
7. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	119
8. CRONOGRAMA	121
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	122
ANEXOS	129
Anexo 1 :Questionário clínico sócio-demográfico.....	130

Anexo 2: Técnica do RFLP.....	138
Anexo 2.1 Extração do DNA cromossomal.....	139
Anexo 2.2 Quantificação e digestão.....	139
Anexo 2.3 Eletroforese e transferência para a membrana.....	140
Anexo 2.4 Preparo da sonda genética.....	140
Anexo 2.4.1 Amplificação do DNA.....	141
Anexo 2.4.2 Purificação e marcação da sonda de DNA.....	141
Anexo 2.4.3 Quantificação da sonda de DNA marcada.....	142
Anexo 2.5 Hibridação do DNA bacteriano com a sonda de DNA marcada.....	142
Anexo 3: Termo de Consentimento Livre Esclarecido.....	144

RESUMO

A tuberculose (TB) é uma doença secular, ainda hoje reconhecida mundialmente como um sério problema de saúde pública e permanece como uma das principais causas de óbitos por doenças infecciosas. Tornou-se possível avançar na produção de conhecimento a respeito da transmissão do *Mycobacterium tuberculosis* e sua permanência em populações urbanas, com a incorporação de métodos de genotipagem em investigações epidemiológicas. O método de investigação do polimorfismo dos fragmentos de restrição da seqüência IS6110 (RFLP IS6110) foi reconhecido como a metodologia padrão de genotipagem para a epidemiologia da TB. Visto que Salvador, capital do estado da Bahia, é uma metrópole com grande densidade populacional e ocupa a terceira posição em relação ao número de casos da doença, o objetivo deste estudo é descrever a epidemiologia molecular da tuberculose pulmonar no município de Salvador (BA) de agosto de 2008 a dezembro de 2009. Será realizado um estudo transversal para analisar dados epidemiológicos e características genóticas dos isolados de *M. tuberculosis* provenientes pacientes com tuberculose pulmonar do município. Os casos serão captados das unidades de saúde com maior demanda de atendimento, com aplicação de um questionário clínico sócio – demográfico e coleta de amostras clínicas para isolamento primário e identificação do *M. tuberculosis*. Para a confirmação da existência de similaridade entre as cepas, empregou-se a técnica do RFLP-IS6110. O perfil genético das cepas será analisado visualmente e com o auxílio do programa de computação GelCompar II, versão 4.0. Dois ou mais isolados serão agrupados em *clusters* quando seus padrões de RFLP são indistinguíveis, isto é, apresentarem bandas idênticas em número e peso molecular. Os grupos genéticos com similaridade maior ou igual a 60% serão considerados membros da mesma família. Os isolados com perfis genéticos únicos, serão considerados como não pertencentes ao grupo genético (*não cluster*). Será realizada análise descritiva das variáveis, bairro de residência, sexo, idade, infecção por HIV, cor da pele, rendimento econômico mensal, grau de escolaridade, alcoolismo, tabagismo, consumo de drogas e história de contato dos pacientes, obtidas a partir do questionário clínico/sócio-demográfico. Se após a genotipagem for constatada a presença de *clusters* na população de estudo, será realizada uma análise bivariada para avaliar os fatores de risco estatisticamente significantes para a formação dos mesmos, utilizando razão de prevalência como medida de associação e IC 95%.

1. REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 Epidemiologia da doença

A tuberculose (TB) é uma doença secular, ainda hoje reconhecida mundialmente como um sério problema de saúde pública e permanece como uma das principais causas de morte por doenças infecciosas.

Segundo a Organização Mundial de Saúde, em 2008 estimou-se 9,4 milhões de casos de tuberculose incidentes no mundo (139 casos/100.000 habitantes). A prevalência mundial no mesmo ano foi de 11,1 milhões de casos, equivalente a 164 casos/100.000 habitantes e 1,3 milhões de óbitos ocasionados pela doença (WHO, 2009). Embora a incidência de TB parecer ter estabilizado em muitos países, o número total de casos continua aumentando devido ao crescimento demográfico da população mundial (WHO, 2009a).

Nas Américas o número de casos de TB corresponde a 3% dos notificados mundialmente (WHO, 2009), com a existência de grandes diferenças entre os países e no interior dos mesmos, em relação à prevalência da doença. Naqueles com economias de mercado estabelecidas, como Estados Unidos, a incidência da tuberculose foi de 5/100.000 habitantes em 2004. Nos países menos desenvolvidos, a incidência foi muito mais alta, sendo 61 vezes maior no Haiti e 43 vezes maior na Bolívia, quando comparados com Canadá e Estados Unidos. (OPAS, 2007).

Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Haiti, Honduras, Guatemala, Guiana, México, Nicarágua, Peru e República Dominicana, foram prioritários na implantação das ações do programa de controle da TB, visto que estes países juntos alocam 80% dos casos notificados na região das Américas (OPAS, 2007). Na América Latina, Peru e Brasil concentram 50% de todos os casos de tuberculose (Santos, 2006).

Os desafios no controle da tuberculose, que é uma doença curável, permanecem devido a dois aspectos: primeiro a proporção de pacientes infectados por cepas multi-droga resistentes aumentou. Além disto, pessoas com doença pulmonar ativa, apresentam grande mobilidade geográfica. Esta

globalização acarreta conseqüências na transmissão de doenças infecciosas e linhagens resistentes podem surgir em qualquer local (Dye *et al.*, 2002).

O aparecimento da Síndrome de imunodeficiência adquirida (HIV/AIDS) promoveu um acréscimo no número de casos notificados de tuberculose em pessoas soropositivas para o vírus em diversos países. O sinergismo entre TB e AIDS é um problema de magnitude mundial e de acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2009) em 2008, 1,4 milhões de indivíduos no mundo, apresentaram tuberculose e AIDS. No mesmo ano, ocorreram 0,5 milhões de óbitos por tuberculose em pacientes HIV-positivos (28/100.000 habitantes).

Outros desafios são co-morbididades como a desnutrição, alcoolismo, silicose e diabetes, que aumentam consideravelmente a susceptibilidade à tuberculose. O impacto da diabetes cresceu em muitas nações em ascensão econômica, tornando-se mais importante fator de risco para tuberculose que AIDS, em países como Índia e México (Comas & Gagneux, 2009).

No Brasil, a tuberculose constitui um problema prioritário de saúde pública, que afeta as populações mais pobres, com idade economicamente ativa (OPAS, 2007). Em 2007, o país apresentou 92.000 casos novos e ocupou 14º lugar em número de casos, estando incluído entre os 22 países com maior ocorrência de TB (WHO, 2009a).

No país, a incidência de tuberculose permaneceu estável nos últimos anos, sendo que em 2008, foram notificados 68.147 casos novos de tuberculose (35,59/100.000 habitantes), dos quais, 56.172 foram formas pulmonares bacilíferas (29,33/100.000 habitantes) e 9.712 extrapulmonares (5,07/100.000 habitantes). Devido às desigualdades socioeconômicas existentes, observa-se uma variação das taxas em diferentes regiões (MS, 2009).

Segundo, Kritski & Ruffino – Netto (2000), a deteriorização nas condições sociais e econômicas tem contribuído também no aumento do número de casos de tuberculose registrados no Brasil. Nas décadas de 80 e 90, o país passou por mudanças na estrutura econômica e social da população que cresceu aceleradamente, com urbanização desordenada. Isto resultou na concentração da pobreza, precárias condições de vida e altos níveis de morbidade e mortalidade nos grupos com pouco acesso a serviços de saúde pública adequados.

A doença apresenta as mais altas incidências nas capitais, devido à alta densidade demográfica, aos bolsões de pobreza e ao elevado risco de infecção. Deve-se também considerar que nessas cidades pela concentração de maior oferta de serviços de saúde, existem melhores condições de diagnóstico e tratamento (Xavier *et al*, 2007).

No estado da Bahia a taxa de incidência de tuberculose em todas as formas, foi de 41/100.000 habitantes em 2007, passando a 39 e 36,2/100.000 habitantes em 2008 e 2009, respectivamente.

A cidade de Salvador, BA, é considerada prioritária no controle da TB pelo Ministério da Saúde, por ser a terceira capital do país em números de casos notificados. O município de Salvador, apresenta em média cerca de 2.300 casos novos de TB pulmonar e extrapulmonar por ano, com uma incidência entre 87,7/100.000, 79,5 e 74,1 habitantes em 2007, 2008 e 2009, respectivamente (SMS/SUIS-SINANNET, 2009).

A mortalidade por tuberculose no estado foi de 2,3/100.000 habitantes no ano de 2009 e na capital decresceu com coeficiente de 4,0, 3,5 e 2,9/100.000 habitantes em 2007, 2008 e 2009 respectivamente (SMS/SUIS-SINANNET, 2009).

1.2 Etiologia

Tuberculose é causada por bactérias gram-positivas conhecidas como “bacilos da tuberculose” ou complexo *Mycobacterium tuberculosis*, que inclui patógenos humanos obrigatórios como *Mycobacterium tuberculosis*, bem como outras micobactérias adaptadas a diversas espécies de mamíferos (Comas & Gagneux, 2009).

As micobactérias pertencem ao gênero *Mycobacterium*, único da família *Mycobacteriaceae* e estão no domínio *Archea*, filo *Actinobacteria*, subclasse *Actinobacteridae*, ordem *Actinomycetales*, subordem *Corynebacterineae* (Brenner *et al*, 2005). O gênero *Mycobacterium* atualmente é constituído por 148 espécies e 11 subespécies reconhecidas oficialmente (Euzéby, 2010).

M. tuberculosis forma o complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) juntamente com *M. bovis* BCG, *M. bovis*, *M. microti*, *M. canetti*, *M. africanum*,

M. caprae e *M. pinnipedii*. As espécies do CMTB causam tuberculose no homem e animais (Brosch *et al*, 2002; Euzéby, 2010).

Apresenta-se como um grupo de bactérias bastante relacionadas geneticamente, o que se reflete no alto grau de conservação evolutiva, com homologia nas seqüências de ácido desoxirribonucléico (DNA) de quase 100% (Pfyffer *et al*, 2003).

As micobactérias apresentam diferenças quanto à morfologia das colônias e propriedades bioquímicas. Compartilham características, como a presença de ácidos graxos de cadeias longas (ácidos micólicos), DNA com 65,6% de conteúdo de guanina e citosina e álcool-ácido resistência quando expostas à coloração pelo método de Ziehl-Neelsen (Goodfellow & Magee, 1998).

Possuem uma parede celular composta por quatro camadas com organização diferente de outros procariotos. A complexidade da parede micobacteriana, em particular a riqueza de lipídios complexos e ácidos micólicos de cadeia longa, explica as propriedades de resistência das micobactérias aos agentes físicos e químicos (Rastogi *et al*, 2001).

Estes ácidos micólicos formam uma cobertura que possibilita a resistência à dessecação, podendo viver por períodos prolongados em condições extremas, desempenham papel importante na resistência aos antibióticos e contribuem para a sobrevivência ambiental destes microrganismos e os protegem de algumas defesas do hospedeiro (Primm *et al*, 2004; Black *et al*, 2002).

O *M. tuberculosis*, apresenta-se como bacilos curvos ou retos com 0,2 a 0,7 µm de largura por 1,0 a 10 µm de comprimento e permanecem no interior dos macrófagos em atividade metabólica muito reduzida, sobrevivendo por anos no organismo em estado de dormência metabólica (Cole *et al.*, 1998). Classifica-se como microrganismo aeróbico estrito, parasita intracelular facultativo, sem flagelos, não formador de esporos e toxinas. Seu tempo de geração é em torno de 18 horas, dependendo da oferta de oxigênio, pH do meio e nutrientes. Este crescimento lento do bacilo condiciona a evolução crônica da doença (Kritski *et al.*, 2000).

1.3 Transmissão e patogênese

A tuberculose é transmitida através da inalação de aerossóis contendo *M. tuberculosis* emitidas na fala, espirro ou tosse de indivíduos bacilíferos e podem ser inaladas pelos contactantes ou depois de algum tempo de permanência no ambiente, sendo mais intensa em áreas urbanas ou em populações fechadas. São eliminadas pequenas partículas de até 10 µm (partículas de *Pflügger*), que contém micropartículas, chamadas núcleo de *Wells*. As partículas maiores tendem a se depositar no solo e mesmo quando inaladas não conseguem chegar aos alvéolos, sendo deglutidas e expectoradas (Bloom, 1994; ATS, 2000).

Após o ressecamento das partículas de *Pflügger*, as micropartículas de *Wells* com até 5 µm podem conter um ou dois bacilos e permanecer em suspensão no ar por várias horas. Quando as partículas de *Wells* são inaladas alcançam os alvéolos pulmonares, iniciando a multiplicação nos macrófagos e as maiores são depositadas no trajeto da árvore traqueobrônquica sendo eliminadas pelo sistema de defesa mucociliar (Bloom, 1994; ATS, 2000).

Em aproximadamente 90% dos indivíduos imunocompetentes, as defesas mediadas pelas células são eficazes e não permitem o desenvolvimento da doença (Kritski, 2000).

A quebra da cadeia epidemiológica da doença somente será proporcionada com a descoberta precoce dos doentes bacilíferos entre os sintomáticos respiratórios e outros grupos de risco, permitindo a introdução de um tratamento eficaz, que além de curar o doente, reduza a capacidade de transmissão (ATS, 2000; Trujillo & Kritski, 2001).

Os principais sintomas da TB pulmonar são: tosse inicialmente seca que persiste por mais de três semanas e leva à formação de uma secreção purulenta; perda de apetite e conseqüente emagrecimento; além de cansaço, febre baixa no final da tarde e sudorese noturna (Kritski, 2000).

Pode haver dois tipos de infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* – o primeiro chamado de infecção primária, que ocorre em indivíduo não infectado previamente pela micobactéria. Neste caso, a infecção pode evoluir para tuberculose primária aguda, permanecer latente, manifestando-se após muitos anos, ou regredir para cura com a cicatrização ou calcificação das lesões. A

infecção secundária pode ser ocasionada por novos contágios (reinfecção exógena) ou pela reativação endógena de focos preexistentes ocorridos durante a infecção primária.

A diferenciação entre TB causada por reativação e doença resultante de infecção exógena recente deve ser bem esclarecida. A doença primária é freqüentemente definida como uma doença ativa que ocorre dentro de cinco anos após uma nova infecção exógena (Sutherland *et al.*, 1982). A reativação da doença ou doença endógena, então, ocorre num período maior que cinco anos após a infecção exógena.

A tuberculose pulmonar apresenta evolução crônica e sua forma clínica é caracterizada principalmente pelo comprometimento dos pulmões, podendo atingir outros órgãos ou ocorrer de forma disseminada (Fiúza de Melo & Afiune, 1993). Uma vez no interior do macrófago, *M. tuberculosis* divide-se em intervalos de 25 a 32 horas. Esta multiplicação bacilar provoca destruição de células, liberação de lisossomas e conseqüente destruição tecidual com reação inflamatória inespecífica e formação de granuloma (*caseum*) que corresponde a lesão inicial da doença ou primo-infecção (Chan & Kaufmann, 1994).

A partir desta lesão os bacilos atingem os linfonodos regionais, onde ocorre dano similar ao produzido no pulmão. A evolução do complexo primário para doença ocorre por liquefação das lesões ganglionares e pulmonares, levando a formação de cavernas tuberculosas, com a multiplicação dos bacilos e disseminação para outras áreas do pulmão e por via linfo-hematogênica podem atingir outros tecidos e órgãos (Fiúza de Melo e Afiune, 1993).

A multiplicação continuará até atingir 10^3 a 10^4 unidades bacilares num período de 2 a 12 semanas. Esta concentração bacilar é suficiente para desencadear uma resposta imune celular, que pode ser capaz de limitar a proliferação. Neste momento, a infecção instalada passa a ser detectável por meio da prova tuberculínica. Os linfócitos T-CD⁴⁺ são responsáveis pela formação do granuloma, morte bacilar ou inibição de sua multiplicação e contenção das lesões, produção de lisozima, necrose tecidual e disseminação da lesão. Além disto, os linfócitos T-CD⁸⁺ também corroboram para a limitação do processo inflamatório (Chan & Kaufmann, 1994).

As lesões ganglionares e pulmonares geralmente desaparecem ou são calcificadas. No entanto, micobactérias viáveis podem permanecer quiescentes

nos espaços caseosos e entre as áreas calcificadas e originar um novo processo infeccioso anos depois da infecção primária, caracterizando uma reativação (Fiúza de Melo & Afiune, 1993).

1.4 Genoma e diferenciação de cepas de *Mycobacterium tuberculosis*

O desenvolvimento de métodos moleculares, com o seqüenciamento e anotação de todo o genoma do *M. tuberculosis* H37Rv (Cole *et al.*, 1998) e outras micobactérias relacionadas, apresentaram um avanço no conhecimento permitindo melhor compreensão da tuberculose.

O genoma de *M. tuberculosis* é composto por 4.411.532 pares de bases nitrogenadas, com aproximadamente 4.000 genes, com elevado conteúdo de guanina e citosina de 65,6%, refletido na composição dos aminoácidos das proteínas. Apresenta 91% do genoma com capacidade codificante, sendo que a função de 606 genes ainda é desconhecida e foram identificados 6 pseudogenes (Moström *et al.*, 2002).

O sequenciamento do genoma de *M. tuberculosis* mostra que esta bactéria apresenta características únicas. Mais de 200 genes são anotados como codificantes para enzimas do metabolismo dos ácidos graxos, compreendendo 6% do total. Entre estes, aproximadamente 100 estão envolvidos com a β -oxidação dos ácidos graxos, enquanto em *E. coli* apenas 50 enzimas estão envolvidas no metabolismo dos ácidos graxos (Bentley *et al.*, 2002). Esta característica do *M. tuberculosis* pode estar relacionada com a sua habilidade de proliferação nos tecidos do hospedeiro (Smith, 2003).

Aparentemente, a maior parte da recombinação gênica ocorre através de transposons, que são elementos inerentemente instáveis e têm o potencial de causar muitos tipos de rearranjos tais como transposições, deleções, inversões e duplicações. Os transposons de organização mais simples são seqüências de inserção (*IS*) sendo que mais de 14 tipos diferentes de *IS* já foram identificadas no genoma do *M. tuberculosis* (Cole *et al.*, 1998; Moström *et al.*, 2002).

As *IS* são elementos de DNA móveis, capazes de se inserirem em diferentes localizações no genoma (Goodfellow & Magee, 1998). O elemento *IS6110* é o mais abundante e melhor caracterizado, sendo que o número de cópias varia entre os isolados. Foi originalmente detectada em uma cepa de *M. tuberculosis*, consiste em uma seqüência de 1355 pb contendo 28 pb idênticos, mas com seqüência repetida invertida em ambas as extremidades (Thierry *et al.*, 1990).

Diversas metodologias podem ser utilizadas para verificar polimorfismos no DNA de *M. tuberculosis*. Estes métodos incluem o polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição (RFLP), hibridização de DNA, a reação em cadeia da polimerase (PCR) e combinações deles (Kremer *et al.*, 1999).

Em 1993, um protocolo para a padronização da técnica de “*Restriction Fragment Length Polymorphism*” (RFLP), baseado na seqüência de inserção *IS6110* foi proposto por van Embden e colaboradores. A metodologia inclui extração do DNA cromossomal, digestão com a enzima *PvuII*, e hibridização por *Southern blotting*, utilizando como sonda um fragmento de 245pb contido no *IS6110*, situado à direita do sítio de clivagem da enzima.

A técnica de RFLP, que utiliza o elemento de inserção *IS6110* para análise de polimorfismo é o método de genotipagem mais amplamente utilizado para diferenciação de cepas de *M. tuberculosis* e tem se mostrado muito útil na realização de diversos tipos de estudos epidemiológicos (Ferrazoli *et al.*, 2000).

Visto que, o *IS6110* é encontrado no complexo *M. tuberculosis* em número variável de cópias inseridas aleatoriamente no cromossomo e o RFLP explora a variabilidade em número e posição genômica deste elemento para gerar padrões específicos de cada linhagem (van Embden *et al.*, 1993). Embora o polimorfismo detectado por esse método seja resultante da própria natureza móvel da *IS6110*, a mobilização desse elemento parece ser um evento raro (Hermans *et al.*, 1991).

A estabilidade do perfil determinado pela *IS6110* durante a infecção humana também foi demonstrada pela análise de cepas isoladas de um mesmo indivíduo em intervalos de oito meses até quatro anos e meio (Cave *et al.*, 1994). Em geral, todas as cepas isoladas de um único paciente em diferentes períodos apresentaram o mesmo perfil e, ocasionalmente, foram detectadas alterações no tamanho ou presença de um ou dois fragmentos.

Lillebaek *et al.* (2003), compararam o padrão de RFLP de 203 isolados de *M. tuberculosis* coletados em 1960 e 4102 isolados coletados na década de 90. Entre estes isolados, 14 padrões de *IS6110* de 1960 foram indistinguíveis dos padrões dos isolados de 1990. Este estudo sugere que a taxa de troca dos padrões de *IS6110* durante o período de latência é muito maior do que durante a doença ativa.

Por outro lado, as linhagens que possuem um número pequeno de cópias de *IS6110*, geralmente inferior a seis, podem apresentar padrões idênticos, mesmo não sendo epidemiologicamente relacionadas (Goulding *et al.*, 2000). Também foram identificadas linhagens que não possuem nenhuma cópia de *IS6110* em algumas regiões geográficas, principalmente no sul da Ásia, tornando estas linhagens não tipáveis pelo *IS6110*-RFLP (Narayanan *et al.*, 2002). Dessa forma, estas linhagens requerem a utilização de outro marcador genético para a sua diferenciação (Gillespie *et al.*, 2000).

O RFLP-*IS6110* quando utilizado em conjunto com os métodos convencionais de investigação epidemiológica tem permitido grandes avanços no conhecimento da transmissão e patogênese da tuberculose. No entanto, esse método é muito trabalhoso e requer grandes quantidades de DNA purificado (aproximadamente 5-10 µg) sendo necessário partir de um crescimento abundante da bactéria. Após a extração do DNA, outras etapas como: digestão com enzima de restrição, eletroforese, hibridação e detecção, demandam tempo e muitos reagentes (Moström *et al.*, 2002).

1.5 Aplicação da genotipagem na epidemiologia da tuberculose

Antes da década de 90, era quase impossível identificar linhagens individuais de *M. tuberculosis* e conseqüentemente acompanhar a transmissão de uma determinada linhagem numa região e/ou instituição. Nas últimas décadas, com o desenvolvimento da genotipagem do *M. tuberculosis*, baseada no reconhecimento de sequências ou padrões genéticos do microrganismo, para individualização de estirpes distintas, tornou-se possível identificar se a micobactéria isolada a partir de diferentes pacientes representa uma fonte comum.

Isto é importante, pois, o controle da tuberculose baseia-se na efetividade do tratamento dos pacientes e contactantes de casos índices com infecção latente, bem como rastreamento dos grupos com elevado risco de infecção. Embora estes métodos tenham sucesso, a existência de regiões com altos índices de transmissão recente indica a necessidade de estudos que auxiliem os programas de controle.

A premissa básica de um sistema de genotipagem é que isolados relacionados epidemiologicamente são derivados de expansão clonal de um único precursor, logo possuem características comuns que diferem daqueles isolados que não estão relacionados (Tenover *et al.*, 1997).

Esta idéia é baseada na suposição de que padrões eletroforéticos idênticos (chamados de *cluster*), observados em duas ou mais pessoas em determinada comunidade, representam casos de doença decorrente de infecção exógena recente e que isolados com padrões únicos (não *cluster*), representam reativação da doença (Alland *et al.*, 1994; Small *et al.*, 1994).

Entretanto, de acordo com Macaraig *et al* (2006), *clusters* também podem ser formados a partir da reativação da doença causada por cepas transmitidas durante períodos epidêmicos, ou seja, nem todos os casos no *cluster* representam transmissão recente e podem resultar da reativação de infecção adquirida mais remotamente. Investigações adicionais são necessárias para determinar se *clusters* de pacientes com TB são provenientes de transmissão recente.

A análise de *clusters* ressalta diversas questões para o controle da tuberculose em áreas urbanas, como reconhecimento de surtos, transmissão nosocomial, o impacto do diagnóstico tardio, identificação de fatores de risco para transmissão recente, rastreamento de clones de importância em saúde pública e avaliação de contaminação cruzada em laboratórios. Além disto, a visualização de casos em diagramas de *clusters* é particularmente útil para encontrar locais de transmissão, bem como similaridades e ligações entre pacientes (Foxman & Riley, 2001, Vries *et al*, 2009).

A habilidade para diferenciar a proporção de casos de tuberculose na comunidade devido à infecção recente e reativação endógena possui grandes implicações na avaliação dos programas de controle da doença (Diel *et al*, 2002), pois algumas linhagens do *M. tuberculosis* podem se disseminar mais

rapidamente, induzindo as formas de TB mais graves, com maior ocorrência de falência de tratamento ou de recidivas do que outras (Vree *et al*, 2007) Para reduzir a transmissão da TB, é importante delinear os padrões pelos quais a doença se espalha na população

A diferenciação entre doença proveniente de reativação ou infecção recente é importante em saúde pública, pois uma alta incidência de TB devido à infecção recente sugere que o programa de controle da tuberculose pode não estar sendo adequado. Por outro lado, nas comunidades em que a maioria dos casos novos de TB é decorrente de reativação da doença reflete um programa inadequado de controle no passado, e estas comunidades devem adequar as estratégias a esta situação (Riley, 2004).

A aplicação destas técnicas em investigações epidemiológicas permite a obtenção de novas informações, abrindo perspectivas referentes ao estudo da dinâmica e determinantes genéticos de transmissão, riscos de doença, identificação de cepas multiresistentes e linhas de transmissão incomuns (Foxman & Riley, 2001; van Embden *et al*, 1993).

No gerenciamento clínico, a aplicação da genotipagem permite a detecção (Allix *et al*, 2004) ou exclusão de erros laboratoriais (Loiez *et al*, 2006). No âmbito da saúde pública, permite a identificação de surtos e cadeias de transmissão (van Soolingen *et al*, 1991). Além disto, aspectos mais específicos podem ser explorados, como variações nos fenótipos bacterianos, virulência e transmissibilidade.

Diversos estudos epidemiológicos (Quadro 1), em populações específicas combinados com técnicas de biologia molecular têm sugerido que pacientes provenientes de países onde a TB é endêmica, apresentam padrões idênticos de RFLP que podem estar relacionados epidemiologicamente (Alland, 1994; Small, 1994). Em países não endêmicos, com transmissão recente de tuberculose, a análise de *clusters* é útil para complementar as investigações epidemiológicas (Vries *et al*, 2009).

Daley e colaboradores (1992) verificaram em pacientes HIV positivos que após a genotipagem dos isolados, todos os pacientes envolvidos no surto apresentaram padrões similares, enquanto aqueles não relacionados ao surto apresentaram padrões diferentes (Foxman & Riley, 2001).

Vynnycky e colaboradores (2003) sugeriram que em locais ou países onde o risco anual para a infecção com o *M. tuberculosis* é relativamente baixo, como nos países desenvolvidos, o uso de RFLP baseado no IS6110 como uma medida de doença resultante de infecção recente pode subestimar a proporção da doença em pessoas jovens e superestimar essa proporção nos pacientes idosos.

Entretanto, em grandes centros urbanos cuja população apresente alta mobilidade, a premissa que padrões de *fingerprinting* do IS6110 em *cluster* representam novos casos de TB surge para sustentar e produzir observações epidemiologicamente e biologicamente plausíveis.

Quadro 1: Estudos sobre epidemiologia molecular da tuberculose realizados no mundo

Autor, ano	Local	Metodologia	Principais resultados
Small <i>et al</i> 1994	São Francisco, Estados Unidos	Estudo Populacional Investigação clínica e sócio-demográfica RFLP <i>IS6110</i>	Alto grau de polimorfismo nas cepas circulantes. Aproximadamente 1/3 dos casos novos resultaram de infecção recente e estabeleceu-se relação entre os casos após investigação epidemiológica
Alland <i>et al</i> 1994	Nova Iorque, Estados Unidos	Estudo populacional Investigação clínica e sócio-demográfica RFLP <i>IS6110</i>	37,5% dos casos incidentes foram por transmissão recente. Etnicidade hispânica, infecção por HIV, multi-droga resistência, idade jovem e residência em áreas pobres foram fatores de risco para transmissão recente
Gutierrez <i>et al</i> 1998	Paris, França	Estudo Populacional Investigação clínica e sócio-demográfica RFLP <i>IS6110</i> RFLP – DR	Forte associação de <i>clusters</i> (35,7%) com indivíduos desabrigados e condições de pobreza, sugerindo papel relevante na transmissão do <i>M. tuberculosis</i> e doença ativa
Jasmer <i>et al</i> 1999	São Francisco, Estados Unidos	Estudo Populacional RFLP <i>IS6110</i> PGRS	Decréscimo nas taxas de TB e casos <i>clusters</i> na população geral e em grupos de risco após intensificação de medidas de controle da doença. Declínio <i>clusters</i> : de 10,4/100.000 em 1992 para 3,8/100.000 em 1997
van Rie <i>et al</i> 1999	África do Sul, África	Estudo Populacional Investigação clínica e sócio-demográfica RFLP <i>IS6110</i>	Na maioria dos pacientes estudados os padrões no RFLP de isolados obtidos após recidiva, foram diferentes dos isolados da primeira infecção, indicando que a reinfecção exógena foi maior causa de recorrência de TB pós- primária
Diaz <i>et al</i> 2001	Havana, Cuba	Estudo Populacional/Investigação de surto institucional Investigação clínica e sócio-demográfica RFLP <i>IS6110</i>	45% dos isolados tiveram padrões idênticos no RFLP, sugerindo que transmissão recente é um fator importante nos casos de TB em Havana. Presença de <i>clusters</i> relacionados com surtos institucionalizados

Autor, ano	Local	Metodologia	Principais resultados
Maconkey <i>et al</i> 2002	St.Louis, Estados Unidos	Estudo populacional Investigação epidemiológica RFLP IS6110 pTBN 12	39% dos pacientes pertencentes a <i>clusters</i> e 46% destes também estabeleceram ligações epidemiológicas. Pacientes jovens, da raça negra, nascidos no país, usuários de drogas e que vivem em áreas pobres frequentemente compartilharam cepas com padrões idênticos. Detecção de contaminação cruzada em laboratórios e transmissão ocupacional
Maguire <i>et al</i> 2002	Londres, Inglaterra	Estudo Populacional Investigação clínica e sócio-demográfica RFLP IS6110 Ligações epidemiológicas entre membros de <i>clusters</i>	Baixo nível de transmissão recente em Londres (14.4%). Aumento no risco da formação de <i>clusters</i> foi associado à idade jovem, alcoolismo, minorias étnicas, resistência à estreptomicina. Maioria dos casos é por reativação de infecção prévia ou importação por imigrantes
Deutekom <i>et al</i> 2003	Amsterdam, Holanda	Estudo Populacional prospectivo Investigação clínica e sócio-demográfica RFLP IS6110	Dos 481 pacientes avaliados, 138 (29%) pertenceram a 43 <i>clusters</i> e 20% destes estavam envolvidos em transmissão recente com ligação epidemiológica
Yeung <i>et al</i> 2006	Hong Kong, China	Estudo Populacional prospectivo Investigação clínica e sócio-demográfica RFLP IS6110 PGRS	Transmissão recente foi estimada em 20-24%. A maioria dos casos de TB ativa foi devido à reativação. Fatores de risco para a formação de <i>clusters</i> foram: <40 anos, residentes permanentes de Hong Kong e com falência no tratamento
Jiménez-Corona <i>et al</i> 2006	México	Estudo Populacional RFLP IS6110 Spoligotyping	Maiores taxas de reinfecção, reativação e falência no tratamento ocorreram entre homens, indicando diferenças de gênero no diagnóstico e tratamento da TB pulmonar

Autor, ano	Local	Metodologia	Principais resultados
Farnia et al 2008	Terã, Irã	Estudo Populacional Investigação epidemiológica Teste de sensibilidade aos fármacos RFLP IS6110 Spoligotyping	Reativação de Infecção endógena causa mais provável de TB ativa. Reinfecção exógena (25% clusters). 41% dos clusters formados por iranianos e afegãos. 38% de transmissão intra-comunidade das estirpes Haarlem e Beijing com alto índice de TB – MDR. Diferentes padrões de susceptibilidade no mesmo cluster
Arora et al 2009	Nova Delhi, Índia	Estudo Populacional Investigação clínica e sócio-demográfica RFLP IS6110 TbD1 PCR	Predominância da linhagem CAS no norte e a estirpe EAI no sul do país. EAI corresponde a uma linhagem bem estabelecida, enquanto CAS pode ter emergido ou foi recentemente introduzida na Índia e está mais relacionada com resistência às drogas. Ambas associadas com transmissão recente
Rodriguez et al 2009	Madri, Espanha	Estudo Populacional RFLP Spoligotyping	29% dos casos formaram clusters, caracterizados por eventos potenciais de transmissão. 53% dos clusters envolvendo imigrantes e nativos. Facilidade na transmissão da TB entre diferentes nacionalidades e entre imigrantes e a população nativa

No Brasil, investigações epidemiológicas têm sido realizadas em diferentes regiões do país empregando o RFLP *IS6110* e outros métodos de genotipagem (Quadro 2).

Quadro 2: Estudos sobre a epidemiologia molecular da tuberculose realizados no Brasil

Autor, ano	Local	Metodologia	Principais resultados
Suffys et al 2000	Rio de Janeiro (capital) – Porto Alegre, Rio Grande do Sul	Estudo Populacional RFLP <i>IS6110</i>	Padrões de <i>IS6110</i> altamente polimórficos: 174 padrões diferentes e 32% dos isolados compartilharam mesmo padrão. Presença de <i>clusters</i> significativamente mais alta em isolados do Rio Grande (36.7%) em comparação com as cepas do Rio de Janeiro (22.6%)

Autor, ano	Local	Metodologia	Principais resultados
Ferrazoli <i>et al</i> 2000	São Paulo (capital)	Estudo populacional RFLP <i>IS6110</i> Investigação clínica e epidemiológica	32% dos pacientes com transmissão recente. Pacientes com HIV aumentam o risco de reinfecção exógena ou reativação endógena de TB. A proporção de casos de TB por reativação endógena em pacientes soropositivos é quase o dobro do que infecção recente. 63% TB-MDR em <i>clusters</i>
Baptista <i>et al</i> 2002	Bauru, São Paulo	Investigação epidemiológica RFLP <i>IS6110</i> DRE- PCR PGRS	42,6% de pacientes com isolados resistentes aos fármacos. Menor frequência de <i>clusters</i> em pacientes com resistência primária quando comparados com isolados obtidos de pacientes com resistência secundária. Alto índice de transmissão recente (26,3%)
Lazarini <i>et al</i> 2007	Rio de Janeiro (capital)	Estudo Populacional Spoligotyping MIRU-VNTR PCR- RFLP <i>IS6110</i> Sequenciamento de DNA	Identificação da linhagem denominada “RD _{Rio} ”, como a fonte mais significativa de transmissão recente da TB no município. Os resultados sugerem que esta linhagem pode causar diferentes formas clínicas da TB
Moreira-Oliveira <i>et al</i> 2008	Campinas, São Paulo	População institucionalizada RFLP <i>IS6110</i>	17 pacientes pertenceram a <i>clusters</i> e viveram pelo menos uma vez juntos durante a sua história prisional. Sete destes foram soropositivos para HIV. Transmissão cruzada de <i>M. tuberculosis</i> entre detentos residentes nas mesmas ou em diferentes instituições carcerárias. Associação entre tratamento prévio, nível educacional e transmissão recente
Malaspina <i>et al</i> 2008	Araraquara, São Paulo	RFLP <i>IS6110</i> Spoligotyping	31,3% das cepas foram agrupadas em <i>clusters</i> . Associação entre transmissão recente e habitação em abrigos públicos. Predominância da família genética T entre os isolados

Autor, ano	Local	Metodologia	Principais resultados
Mendes <i>et al</i> 2008	Rio de Janeiro (capital)	Estudo populacional RFLP <i>IS6110</i>	Sexo feminino teve forte relação com <i>cluster</i> . A transmissão entre comunicantes domiciliares e extra-domiciliares esteve associada a 20% e 60% dos <i>clusters</i> , respectivamente. Contato extra-domiciliar pode ter contribuído para a transmissão em áreas superlotadas. 26% dos <i>clusters</i> tiveram transmissão de resistência primária e cepas multi-droga resistentes
Malaghini <i>et al</i> 2009	Paraná, Curitiba	Estudo populacional Mixed-linker PCR DNA fingerprinting RFLP <i>IS6110</i>	Somente dois isolados (3.2%) formaram <i>clusters</i> . Predomínio de reativação de infecção latente

Deste modo, a compreensão da etiologia e da dinâmica de transmissão de uma doença infecciosa é de fundamental importância para direcionamento mais preciso das medidas de controle da doença. Para diminuir a transmissão da tuberculose em uma comunidade é necessária a compreensão dos mecanismos pelos quais a doença se expande na população (Foxman & Riley, 2001).

2. JUSTIFICATIVA

A incorporação de métodos de genotipagem, tais como o RFLP *IS6110*, em investigações epidemiológicas permite avançar na produção de conhecimento a respeito da transmissão do *Mycobacterium tuberculosis* e sua permanência em populações urbanas.

Entretanto, há ausência de estudos que abordem os aspectos relacionados à epidemiologia molecular da tuberculose, a fim de compreender a propagação do *Mycobacterium tuberculosis* e dinâmica transmissão da doença no município de Salvador (BA).

Deste modo, faz-se necessário estudar os perfis e distribuição das cepas de *M. tuberculosis* isoladas de pacientes da cidade de Salvador (BA) a fim de elucidar o seu papel na ocorrência e manutenção da tuberculose no município a fim de contribuir na proposição de novas estratégias de intervenção para o controle da doença.

3. PERGUNTA DE INVESTIGAÇÃO

Considerando-se que Salvador é uma metrópole de grande densidade populacional, qual o perfil genético das cepas de *Mycobacterium tuberculosis* circulantes no município e quais as suas implicações na transmissão da tuberculose?

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Descrever o perfil molecular isolados de *Mycobacterium tuberculosis*, bem como as características sócio – demográficas dos casos de TB pulmonar residentes no município de Salvador (BA) de agosto de 2008 a dezembro de 2009.

4.2 Objetivos Específicos

4.2.1 Descrever as características sócio – demográficas dos casos de Tb pulmonar em Salvador

4.2.2 Caracterizar cepas de *Mycobacterium tuberculosis* circulantes no município de Salvador (BA)

4.2.3 Identificar associação entre informações clínico-epidemiológicas dos pacientes com tuberculose pulmonar e padrões de cepas de *Mycobacterium tuberculosis*

5. METODOLOGIA

5.1 Desenho do estudo

Será realizado um estudo transversal para analisar dados epidemiológicos e características genóticas dos isolados de *M. tuberculosis* provenientes de pacientes com tuberculose pulmonar em Salvador (BA), de agosto de 2008 a dezembro de 2009.

O presente trabalho é parte integrante do projeto intitulado “Estudo da distribuição espacial e padrões de transmissão da tuberculose em Salvador através de técnicas moleculares e de análises de redes complexas”, em andamento no município. Este estudo é desenvolvido pelo grupo de pesquisa em Doenças Infecciosas e Deficiências Nutricionais do Instituto de Saúde Coletiva da Universidade Federal da Bahia, sendo financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e com aprovação CEP no. 012/07.

5.2 População de estudo

O município de Salvador, capital do estado da Bahia, ocupa uma extensão territorial de 707 km². Em 2008, o total de residentes no município foi de 2.948.733 habitantes (IBGE, 2009).

A sua organização político-administrativa compreende 18 Regiões Administrativas e 12 Distritos Sanitários, os quais sediam 102 Unidades de Saúde. Destas, existem 38 unidades de atenção aos pacientes com tuberculose em todo o município. Além disto, a rede hospitalar dispõe de duas unidades de referência para o atendimento dos casos de TB.

O Plano Municipal de Controle da Tuberculose, em Salvador, tem como objetivo implementar medidas de controle da TB como a detecção de casos novos, tratamento e cura. Inicialmente, foi listado o número de casos de TB em cada distrito sanitário e foram identificadas as unidades de saúde que notificam grande número casos em cada distrito, as quais foram incluídas no estudo (Quadro 3).

A população do estudo compreende indivíduos atendidos nas Unidades Básicas de Saúde e Serviços de Referência para a doença diagnosticados com tuberculose pulmonar ativa, com baciloscopia e cultura positiva para *Mycobacterium tuberculosis*, sem tratamento prévio, maiores de 15 anos de idade, na cidade de Salvador entre agosto de 2008 e dezembro 2009.

Quadro 3: Frequência de casos de tuberculose notificados em 2005 nas unidades selecionadas para o estudo e proporção dos casos que compuseram a população de estudo por unidades de captação, com respectivos distritos sanitários

UNIDADE DE SAÚDE	DISTRITO SANITÁRIO	CASOS NOTIFICADOS (n / %)
HEOM	4º DS Liberdade	1364 / 38,9
IBIT	6º DS Barra/Rio Vermelho	374 / 10,6
2º Centro Ramiro de Azevedo	1º DS Centro Histórico	358 / 10,2
6º Centro Rodrigo Argolo	9º DS Cabula/Beiru	158 / 4,5
Adroaldo Albergaria	11º DS Subúrbio Ferroviário	100 / 2,8
3º Centro Profº Bezerra Lopes	4º DS Liberdade	147 / 4,2
Hospital Santo Antônio	2º DS Itapagipe	124 / 3,5
13º Centro Eduardo Mamede	8º DS Mussurunga	47 / 1,3
TOTAL		2672 / 76,2

Fonte: SMS/SUIS-SINANNET

5.3 Coleta de dados

Os instrumentos de coleta de dados foram compostos por um questionário, com questões relativas a aspectos clínico-epidemiológicos dos pacientes para a obtenção de informações como sexo, idade, endereço, cor da pele (auto-referida), rendimento econômico mensal, renda familiar, grau de

escolaridade, tabagismo, alcoolismo, consumo de drogas, história prévia de contato e infecção por HIV (Anexo1).

Para a elaboração do questionário, foram consultados questionários de diversos estudos e após finalização, o mesmo foi testado, corrigido e submetido a novo teste.

As unidades de saúde participantes foram informadas oficialmente sobre o início da coleta e foram selecionadas equipes de campo, compostas por técnicos de enfermagem e estudantes de graduação previamente treinados. Os entrevistadores foram orientados para a correta e padronizada aplicação dos questionários, de forma a garantir a fidedignidade e precisão dos dados coletados. Além disto, todas as unidades do estudo foram supervisionadas por enfermeiras e relatórios mensais foram elaborados com a quantidade de pacientes entrevistados.

Os entrevistadores compareceram às unidades de segunda a sexta, requisitando pacientes com suspeita de tuberculose pulmonar e baciloscopia positiva participarem da pesquisa através da entrevista e coleta da amostra clínica. As entrevistas foram iniciadas somente após a apresentação dos objetivos do estudo, do caráter sigiloso das informações e leitura do termo de consentimento livre esclarecido.

Após a coleta todos os questionários serão revisados e a ausência de dados ou possíveis inconsistências serão retornadas ao entrevistador para complementação da informação através do prontuário médico ou do próprio entrevistado. Cada questionário receberá um código, composto de seis dígitos.

5.4 Coleta das amostras clínicas

A coleta das amostras de escarro ou lavado broncoalveolar foram obtidas por expectoração em local arejado. O material foi coletado em recipiente devidamente identificado com o nome do paciente e data da coleta.

Os pacientes foram orientados a inspirar profundamente, reter o ar por alguns instantes nos pulmões e em seguida, tossir e escarrar o material clínico diretamente no recipiente. Repetiu-se este procedimento duas vezes até obter-se quantidade suficiente para a baciloscopia. O recipiente foi tampado e

colocado em saco plástico com a tampa para cima e em seguida recomendou-se a lavagem das mãos pelos pacientes (Ministério da Saúde, 2005).

As amostras com baciloscopia positiva foram devidamente acondicionadas em isopor, protegidas da luz solar e encaminhadas ao Laboratório Central de Saúde Pública Professor Gonçalo Moniz – LACEN/BA para a realização do isolamento primário e identificação de *Mycobacterium tuberculosis*

5.5 Instrumentos de pesquisa

- Questionário padronizado

5.6 Critérios de inclusão

- Casos de tuberculose pulmonar ocorridos durante os meses de Agosto de 2008 e Dezembro de 2009;
- Residentes em Salvador;
- Com idade mínima de 15 anos;
- Confirmação do diagnóstico, com baciloscopia e cultura positiva para *Mycobacterium tuberculosis*;
- Sem histórico de multiresistência (pacientes multiresistentes são acompanhados em serviço de saúde específico com tratamento supervisionado);
- Tenha concordado em participar da pesquisa, assinando o termo de livre consentimento livre esclarecido;

5.7 Critérios de exclusão

Foram excluídos todos aqueles que:

- Não concordaram em assinar o termo de consentimento livre esclarecido e não responderam o questionário durante a entrevista;
- Não confirmaram as informações referentes aos critérios de

inclusão;

- Não residentes em Salvador;

5.8 Isolamento das cepas de *Mycobacterium tuberculosis*

As amostras foram descontaminadas pelo método *Petroff* e inoculadas em meio *Lowenstein Jensen* (LJ). Incubou-se em estufa a 37°C por até oito semanas, acompanhando semanalmente o crescimento das culturas.

As colônias de *M. tuberculosis* apresentam cor creme, são rugosas, desenvolvem-se na superfície do meio e não alteram a cor do LJ.

Todos os isolados foram submetidos a testes de identificação para *Mycobacterium tuberculosis*, tais como: produção de niacina, redução do nitrato, inibição do crescimento em presença de ácido para-nitrobenzóico 500 µg/mL (PNB) e resistência à hidrazida do ácido tio-feno-2-carboxílico 5 µg/mL (Ministério da Saúde, 2005).

Os isolados foram congelados em 2 mL de meio *Sauton* enriquecido com 20% de glicerol a -70 °C no Laboratório Nível de Biossegurança 3 do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz / FIOCRUZ para posterior extração do DNA bacteriano e genotipagem.

As alíquotas de *M. tuberculosis* foram descongeladas e repicadas em meio *Lowenstein Jensen*. Incubou-se em estufa a 37°C por até oito semanas e as culturas com crescimento satisfatório de colônias foram selecionadas para a extração do DNA.

5.9 Caracterização das cepas de *M.tuberculosis* pelo método de RFLP-IS6110

Para a confirmação da existência de similaridade entre as cepas, será utilizada a técnica de investigação do polimorfismo dos fragmentos de restrição da seqüência IS6110 (RFLP) no Laboratório de Biologia Molecular/Setor de Micobactérias do Instituto Adolfo Lutz, de acordo com as recomendações propostas por van Embden *et al* (1993) e está descrita detalhadamente no anexo 2.

5.10 Análise do perfil genético das cepas

O perfil genético de cada cepa de *M. tuberculosis* será analisado visualmente e com o auxílio do programa de computação GelCompar II, versão 4.0 para “Windows” (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica). A análise será realizada com base na cópia das membranas obtidas por digitalização e após o alinhamento dos fragmentos de DNA das preparações teste com os da preparação da cepa de referência *M.tuberculosis* 14323 (PM = 14.4, 7.2, 7.0, 4.4, 3.6, 3.0, 2.3, 2.0, 1.8, 1.5, 1.4, 1.0 kb), aplicados nas laterais de cada gel e na 10ª posição.

O número de cópias da IS6110 será determinado de acordo com o número de fragmentos de DNA hibridados com a respectiva sonda e visualizados em forma de banda compacta na membrana de náilon. Para cada banda visualizada, considera-se uma cópia da IS6110.

A comparação dos perfis genéticos, designados aleatoriamente por letras do alfabeto seguidas ou não de números, resultará na classificação das cepas em pertencentes ou não a um grupo genético. Dois ou mais isolados serão considerados pertencentes a um *cluster* quando seus padrões de RFLP forem indistinguíveis, isto é, apresentarem bandas idênticas em número e peso molecular. Os isolados com perfis genéticos únicos, ou seja, com padrões de RFLP totalmente distintos dos demais isolados, serão considerados como não pertencentes ao grupo genético (*não cluster*).

Para a construção do dendrograma, os perfis genéticos serão comparados com base no peso molecular e no número de cópias de fragmentos hibridados com a sonda IS6110 pelo método Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA), utilizando-se o coeficiente de Dice, seguindo as instruções do manual do Programa GelCompar II, versão 4.0 (Applied Maths).

Os pacientes com duplicidade de informações, pertencentes a *clusters* com amostras processadas na mesma data e cepas que apresentarem menos que cinco cópias da seqüência de inserção IS6110 serão excluídos do estudo.

6. PLANO DE ANÁLISE

As variáveis obtidas a partir do questionário clínico/sócio-demográfico são: local de residência (bairro), sexo, idade, infecção por HIV, cor da pele (auto-referida), rendimento econômico mensal, grau de escolaridade, alcoolismo, tabagismo, consumo de drogas e história de contato dos pacientes. As variáveis *Cluster* e *Não-cluster* serão definidas de acordo com o perfil das cepas na análise molecular.

Após a digitação, será realizada a preparação do banco de informações para avaliar a distribuição e características das variáveis, validação, análise de consistência, presença de dados perdidos e informações repetidas, detecção de erros e posterior correção e definição da apresentação final das variáveis.

A análise descritiva será realizada utilizando-se tabelas de freqüências, “Box plots” e histogramas, visando identificação da presença de “*outliers*” e do padrão de distribuição das variáveis. Para avaliar normalidade dos dados serão utilizados gráficos de distribuição normal. As variáveis serão apresentadas como médias, desvio padrão freqüências e percentis se ou contínuas ou discretas.

Os testes de qui – quadrado ou teste exato de Fischer e *T* de *Student* serão empregados para avaliar diferenças entre subpopulações, para variáveis categóricas e contínuas, respectivamente. Os dados serão confrontados, criticamente, com a literatura nacional e internacional sobre o assunto.

Se após a genotipagem for constatada a presença de *clusters* na população de estudo, será realizada uma análise bivariada para avaliar os fatores associados para a formação dos mesmos, utilizando razão de prevalência como medida de associação e intervalo de confiança de 95%.

7. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Os pacientes foram informados sobre os objetivos do projeto e assegurados da possibilidade de recusa. Antes da coleta dos dados, foi solicitada a autorização prévia para a realização da pesquisa, através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), de acordo com as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (Resoluções 196/96 e 304/2000) do Ministério da Saúde.

O sigilo dos dados clínico - epidemiológicos coletados foi assegurado através do adequado treinamento da equipe envolvida com a coleta de dados, além do comprometimento ético dos participantes no manuseio e tratamento destas informações. Deste modo, a confidencialidade das informações constantes nos instrumentos de pesquisa será garantida em todas as etapas da investigação e a publicação dos resultados ocorrerá de maneira tal, que os sujeitos jamais serão identificados.

Todos os dados são arquivados em local apropriado, não sendo utilizados para qualquer outra finalidade, além dos objetivos propostos nesta investigação.

O material biológico coletado é mantido em local adequado nos laboratórios envolvidos no estudo e utilizados apenas para os objetivos definidos no consentimento informado.

A participação dos sujeitos na pesquisa foi voluntária e estes poderão abster do processo de investigação a qualquer momento. O objetivo e os procedimentos da pesquisa foram informados a todos os participantes, assim como a garantia do anonimato dos sujeitos e confidencialidade dos dados em qualquer relatório ou documento que pode ser produzido a partir dela.

As atividades desenvolvidas ao longo desta pesquisa não trazem risco adicional às pessoas submetidas às investigações, pois os procedimentos programados – exame clínico, coleta de escarro para baciloscopia e cultura já foram exaustivamente testados e consagrados para uso nas ações de Saúde Pública. Na atualidade, estes procedimentos estão amplamente incorporados às ações de saúde desenvolvidas nos Programas de Controle da Tuberculose no âmbito do Sistema Único de Saúde.

Os laboratórios envolvidos possuem condições de biossegurança adequadas, sendo que o Laboratório do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz/FIOCRUZ e do Instituto Adolpho Lutz são de nível 3.

7. CRONOGRAMA

Quadro 2 : Distribuição das atividades do projeto nos meses/anos 2008-2010

Atividades	Agosto 2007 - Julho 2008	Agosto- Dezembro/ 2008	Janeiro – Dezembro/ 2009	Janeiro – Dezembro/ 2010
Padronização dos instrumentos e treinamento da equipe de campo	X			
Coleta dos dados e amostras clínicas		X	X	
Isolamento e identificação das cepas de <i>M. tuberculosis</i>		X	X	
Organização do banco de amostras e extração do DNA			X	
Análise por RFLP			X	X
Compilação dos resultados e análise estatística				X
Revisão bibliográfica e elaboração de trabalho científico		X	X	X

9. REFERÊNCIAS

Alland DG, Kalkut E, Moss AR, Mcadam RA, Hahn JA, Bosworth W, *et al.* Transmission of tuberculosis in New York City. An analysis by DNA fingerprinting and conventional epidemiologic methods. *N.Engl.J. Med.* 1994; 17:1710-1716.

Allix C, Supply P, Fauville-Dufaux M. Utility of fast mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number tandem repeat genotyping in clinical mycobacteriological analysis. *Clin Infect Dis.* 2004; 39 (6):783-9.

Arora J, Singh BU, Suresh N, Rana T, Porwal C, Kaushik A, Pande NJ. Characterization of predominant *Mycobacterium tuberculosis* strains from different subpopulations of India. *Infection, Genetics and Evolution.*2009; 581:1–8.

ATS(American Thoracic Society). Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children.The official statement of the American Thoracic Society and the Centers of Disease Control and Prevention (CDC) and the Council of the Infectious Disease Society of America. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161: 1376-1395.

Bentley AP, Barton MH, Lee MD, Norton NA, Moore JN. Antimicrobial-induced endotoxin and cytokine activity in an in vitro model of septicemia in foals. *Am J Vet Res.* 2002; 63(5):660-8.

Black GF, Weir RE, Floyd S, Bliss L, Warndorff DK, Crampin AC, *et al.* BCG-induced increase in interferon-gamma response to mycobacterial antigens and efficacy of BCG vaccination in Malawi and the UK: two randomised controlled studies. *Lancet.* 2002 ;359(9315):1393-401.

Bloom BR, Flynn J, McDonough K, Kress Y, Chan J. Experimental approaches to mechanisms of protection and pathogenesis in M. tuberculosis infection. *Immunobiology.* 1994 ;191(4-5):526-36.

Brasil, 2009. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância Epidemiológica. Tuberculose. Dados e indicadores. Epidemiologia da TB no Brasil. Disponível em <<http://portal.saude.gov.br/saude>>.Acessado em: 20 de março de 2010

Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K *et al.* A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex.Proc *Natl Acad Sci.* 2002;99:3684-89.

Caminero JA, Pena MJ, Herrero CMI, Rodríguez JC, Cabrera P *et al.* Epidemiological evidence of the spread of a *Mycobacterium tuberculosis* strain of the Beijing genotype on Gran Canaria Island. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2001; 167:1165–1170.

Camus JC, Pryor MJ, Médigue C, Cole ST. Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Microbiology*. 2002; 148(10): 2967-73.

Cave DM, Eisenach DKG, Templeton G, Salfinger M., Mazurek G, Bates HJ, Crawford TJ. Stability of DNA Fingerprint pattern produced with *IS6110* in strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal Of Clinical Microbiology*. 1994; 32(1): 262-266.

Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, *et al*. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. 1998; 393: 537-544.

Comas I & Gagneux S. The past and future of tuberculosis research. *Plos Pathog*. 2009; 5(10): e1000600.

Daley CL, Small PM, Schechter GF, Schoolnik GK, McAdam RA, Jacobs WR Jr. An outbreak of tuberculosis with accelerated progression among persons infected with the human immunodeficiency virus. An analysis using restriction-fragment-length polymorphisms. *N Engl J Med*. 1992; 326(4): 231-5.

Diaz R, Gomez IR, Restrepo E, Rumbaut R, Sevy CJ, Valdivia JA, *et al*. Transmission of tuberculosis in Havana, Cuba: a molecular epidemiological study by *IS6110* restriction fragment length polymorphism typing. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2001; 96: 437-443.

Diel R, Schneider S, Meywald WK, Ruf MC, Rüsç GS, Niemann S. Epidemiology of tuberculosis in Hamburg, Germany: long-term population-based analysis applying classical and molecular epidemiological techniques. *J. Clin. Microbiol*. 2002; 40: 532-539.

Dye C, Espinal MA, Watt CJ, Mbiaga C, Williams BG. Worldwide incidence of multidrug-resistant tuberculosis. *J Infect Dis*. 2002; 15: 1197-1202.

Euzéby JP. List of bacterial names with standing in nomenclature. Disponível em: <http://www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.htm>. Acesso em 26 de março de 2010.

Ferrazoli L, Palaci M, Marques MRL, Jamal FL, Afiune BJ, Chimara E, *et al*. Transmission of tuberculosis in an endemic urban setting in Brazil. *Int. J. Tuberc. Lung. Dis*. 2000; 4: 1-8.

Fiuza MFA, Afiune BJ. Quimioterapia da tuberculose: bases, condutas e procedimentos. *Jornal de Pneumologia*. 1993; 19: 42-49.

Foxman B & Riley L. Molecular epidemiology: focus on infection. *Am. J. Epidemiol*. 2001; 153: 7-13.

Friedman CR, Quinn GC, Kreiswirth BN, Perlman DC, Salomon N, Schluger N, *et al.* Widespread dissemination of a drug-susceptible strain of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis.* 199;176(2):478-84.

Gillespie SH, Dickens A, Mchugh DT. False molecular clusters due to nonrandom association of *IS6110* with *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 2000;38:2081-2086.

Goodfellow M & Magee JG. Taxonomy of mycobacteria. *Mycobacteria. Vol I - Basic Aspects.* 1998.

Goulding JN, Stanley J, Sauders N, Arnold C. Genome-sequence-based fluorescent amplified-fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 2000;38:1121-1126.

Gutiérrez MC, Vincent V, Aubert D, Bizet J, Gaillot O, Lebrun L, *et al.* Molecular fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* and risk factors for tuberculosis transmission in Paris, France, and surrounding area. *J. Clin. Microbiol.* 1998. 36:486-492.

Hermans PWM, van Soolingen D, Bik ME, Haas WEP, Dale WJ, van Embden JDA. The insertion element *IS986* from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Infect. Immun.* 1991;59: 2695-2705.

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/>. Acessado em 15 de março de 2010.

Kremer K, van Soolingen D, Frothingham R, Haas HW, Hermans MWP, Martín C, *et al.* Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 37: 2607-2618.

Kritski AL. & Ruffino-Netto A. Health sector reform in Brazil: impact on tuberculosis control. *Int. J Tubercu Lung Dis.* 2000;4 (7):622–626.

Kritski AL. Tuberculosis preventive therapy for HIV-infected persons in less developed countries. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2000;4:76-81.

Lazzarini OCL, Huard CR, Boechat LN, Gomes MH, Oelemann CM, Kurepina N, *et al.* Discovery of a novel *Mycobacterium tuberculosis* lineage that is a major cause of tuberculosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Clinical Microbiology* 2007;45 (12):3891–3902.

Lillebaek T, Dirksen A, Baess I, Strunge B, Thomsen V, Andersen AB. Molecular evidence of endogenous reactivation *Mycobacterium tuberculosis* after 33 years of latent infection. *J. Infec. Dis.* 2003;185: 401-404.

Loñez C, Willery E, Legrand JL, Vincent V, Gutierrez MC, Courcol RJ, *et al.* Against all odds: molecular confirmation of an implausible case of bone tuberculosis. *Clin Infect Dis.* 2006;42(11):e86-8.

Lopez B, Aguilar D, Orozco H, Burger M, Espitias C, Ritacco V, *et al.* A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. *Clin. Exp. Immunol.* 2003;133: 30–37.

Macaraig M, Agerton T, Driver CR, Munsiff SS, Abdelwahab J, Park J. Strain-Specific differences in two large *Mycobacterium tuberculosis* genotype clusters in isolates collected from homeless patients in New York City from 2001 to 2004. *J. Clin. Microbiol.* 2006;44:2890–2896.

Maguire H, Dale WJ, McHugh DT, Butcher DP, Gillespie HS, Costetsos A, *et al.* Molecular epidemiology of tuberculosis in London 1995-7 showing low rate of active transmission. *Thorax.* 2002;57:617-622.

Malaghini M, Brockelt RS, Burger M, Kritski A, Thomaz SV. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolated in the State of Parana in southern Brazil. *Tuberculosis.* 2009; 89:101–105.

McConkey SJ, Willians M, Weiss D, Adams H, Cave DM, Yang Z, Lindner T, Bailey CT. Prospective use of molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* by use of restriction fragment-length polymorphism in a public tuberculosis-control program. *Clin. Infec. Dis.* 2002; 34:612-619.

Mendes MJ, Machado AMS, Lourenço CM, Ferreira CMR, Fonseca SL, Saad FHM. Molecular diversity of *Mycobacterium tuberculosis* strains in slum área of Rio de Janeiro, Brazil. *Journal Braz Pneumology.* 2008;34 (12):1063-1068.

Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Centro de Referência Prof. Hélio Fraga. Manual de Bacteriologia da Tuberculose. Rio de Janeiro, 2005;3ªed.

Moström P, Gordon M, Sola C, Ridell M, Rastogi N. Methods used in the molecular epidemiology of tuberculosis. *Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2002;8:694-704.

Narayanan S, Das S, Garg R, Hari L, Rao BV, Frieden RT, *et al.* Molecular epidemiology of tuberculosis in a rural area of high prevalence in south India: implications for disease control and prevention. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40: 4785-4788.

Oliveira MMS, Oliveira HB, Pace F, Stehling EG, Rocha MMM, Aily DCG, *et al.* Molecular Genotyping and Epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates Obtained from Inmates of Correctional Institutions of Campinas, Southeast Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases.* 2008;12(6):487-493.

Organização Panamericana de Saúde. Saúde Nas Américas. 2007;Vol.1 e 2: 124-130 -15

Farnia P, Masjedi RM, Varahram M, Mirsaeidi M, Ahmadi M, Khazampour M, *et al.* The recent-transmission of *Mycobacterium tuberculosis* strains among iranian and afghan relapse cases:a DNA-fingerprinting using RFLP and spoligotyping. *BMC Infectious Diseases*.2008;8(109):1-7.

Pfyffer GE, Brown EBA, Wallace RJ. *Mycobacterium*:General characteristics, isolation, and staining procedures. *Manual of clinical microbiology*.2003;8:532-59.

Prefeitura de Salvador. SMS/SUIS-SINANNET/.Disponível em <http://www.salvador.ba.gov.br>. Acessado em 19 de março de 2010.

Primm TP, Lucero CA, Falkinham JO.Health impacts of environmental mycobacteria. *Clin Microbiol Rev.* 2004;17(1):98-106.

Rastogi N, Legrand E, Sola C.The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. *Rev Sci Tech.* 2001;20(1):21-54.

Riley L. Molecular epidemiology of infectious disease: principles and practices. *American Society for Microbiology Press.* 2004.

Rodriguez NA, Chaves F, Inigo J, Bouza E, Viedma GD, *et al.*Transmission permeability of tuberculosis involving immigrants, revealed by a multicentre analysis of clusters. *Clin Microbiol Infect.* 2009;15:435–442.

Santos F, Ezio T.Política de TB no Brasil - uma perspectiva da sociedade civil: tempos de mudanças no controle da tuberculose no Brasil. Rio de Janeiro. Relatório Técnico 2006;*Open Society Institute*:85.

Secretaria da Saúde do Estado da Bahia (SESAB). Disponível em: <http://www.saude.ba.gov.br/divep> . Acessado 19 de março de 2010.

Serpa AJ, Teeter DL, Musser MJ, Graviss AE. Tuberculosis: Disparity between US-born Blacks and Whites,Houston,Texas,USA. *Emerging Infectious Diseases.* 2009; 15 (6):899-904.

Small PM, Hopewell CP, Singh PS, Paz A, Parsonnet J, Ruston DC, *et al.*The epidemiology of tuberculosis in San Francisco. A population-based study using conventional and molecular methods. *N. Engl. J. Med.*1994;330:1703-1709.

Smith I. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin Microbiol Rev.* 2003;16:463-96.

Suffys PN, Araújo IME, Rossetti LM, Zaha A, Barroso WE, Barreto WMA, *et al.* Usefulness of IS6110-restriction fragment length polymorphism typing of Brazilian strains of *Mycobacterium tuberculosis* and comparison with an international fingerprint database. *Res. Microbiol.*2000;151:343-351.

Tenover FC, Arbeit DR, Goering VR. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 1997;18:426-439.

Thierry D, Brisson NA, Vincent-Lévy-Frédault V, Nguyen S, Guesdon JL, Gicquel B, *et al.* Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence IS6110, and its application in diagnosis. *J Clin Microbiol.*1990; 28(12): 2668-73.

Trujillo WFC & Kritski AL. Tuberculose. *Medicina Tropical: abordagem atual das doenças infecciosas e parasitárias*. Rio de Janeiro, 2001. Editora Cultura Médica.

van Deutekom H, Hoijing PS, Haas PEW, Langendam WM, Horsman A, van Soolingen D, *et al.* Clustered tuberculosis cases: do they represent recent transmission and can they be detected earlier?. *Am J Respir Crit Care Med.*2004 ;169 (7):806-10.

van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, *et al.* Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol.*1993;31:406-409.

van Rie A, Warren R, Richardson M, Victor CT, Gie PR, Enarson AD, *et al.* Exogenous Reinfection as a cause of recurrent tuberculosis after curative treatment. *The New England Journal of Medicine.*1999;341(16):1174-1179.

van Soolingen D, Hermans MWP, Haas WEP, Soll RD, van Embden ADJ. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.*1991; 29:2578-2586.

van Soolingen D, Hermans PW, Haas PE, Soll DR, van Embden JD. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol.*1991; 29(11):2578-86.

Vree M, Bui DD, Dinh SN, Nguyen CV, Borgdorff VVM, Cobelens GF. Tuberculosis trends Vietnam . *Emerg Infect Dis.*2007; 13(5):796-7.

Vries G, van Hest AHR, Burdo CAC, van Sooligen D, Richardus HJA. *Mycobacterium tuberculosis* cluster demonstrating the use of genotyping in urban tuberculosis control. *BMC Infectious Diseases* 2009;9:1-8.

Vynnycky E, Borgdorff WM, van Soolingen D, Fine EMP. Annual *Mycobacterium tuberculosis* Infection Risk and Interpretation of Clustering Statistics. *Emerging Infectious Diseases.*2003;9(2):176-183.

WHO (World Health Organization). Global tuberculosis control: a short update to the 2009 report. *WHO Report 2009*, Geneva: 48.

WHO (World Health Organization). Global tuberculosis control : surveillance, planning, financing, WHO report 2009. Disponível em http://www.who.int/tb/publications/global_report/2009/pdf/fullreport.pdf. Acesso em 11 de março de 2010

Xavier MI & Barreto ML. Tuberculosis in Salvador, Bahia, Brazil, in the 1990s. *Cad Saude Publica*. 2007; 23(2): 445-53.

Yeung MC, Kam KM, Leung CC, Wang J, Yew WW, Lam CW, *et al*. Population-based prospective molecular and conventional epidemiological study of tuberculosis in Hong Kong. *Respirology*. 2006; 11, 442–448.

ANEXOS

Anexo 1: Questionário clínico-sócio demográfico



Universidade Federal da Bahia

Instituto de Saúde Coletiva Rua Basílio da Gama, SN, Canela - 40.110-170 Salvador- Bahia- Brasil -
☎(071) 3283-7445
Informações: Dra. Susan Pereira ; Enfª. Rosana Mota (8124-5982)

I. DADOS GERAIS

Número do questionário: / / / /

1. **Unidade de Saúde:**
2. **Distrito Sanitário:** 4. **Número do SINAN:**
3. **Número do prontuário:** 5. **Data da coleta de dados:** / /

II. DADOS PESSOAIS

6. **Nome:**
7. **Apelido:** 8. **Idade:** 9. **Data de nascimento:** / /
10. **Sexo:** (1) **Masculino** (2) **Feminino**
11. **Naturalidade:** 12. **Data de início do tratamento:** / /
13. **Nome da mãe:**

III. DADOS DO DOMICÍLIO

14. Endereço:								
15. Número		16. Complemento						
17. Ponto de referência. (Centro comercial, Hospital, Escola, Igreja, Posto de gasolina, Farmácia, Oficina, etc).								
18. CEP:								
19. Telefones:	Celular:				Fixo:			
Outro:								
20. Setor Censitário (Preenchido pelo digitador)								
21. Bairro:					22. Código do Bairro (Preenchido pelo digitador):			

IV. DADOS SÓCIO-ECONÔMICOS

23. Estado civil: 1. Solteiro 2. Casado/ União estável 3. Separado / Divorciado 4. Viúvo 5. Outros	V.23
24. Grau de escolaridade : 1. Analfabeto 2. Alfabetização de adultos 3. Antigo primário 4. Fundamental ou 1º grau incompleto 5. Fundamental ou 1º grau completo 6. Ensino médio ou 2º grau incompleto 7. Ensino médio ou 2º grau completo 8.. Superior incompleto 9. superior completo 10. outros-----	V.24
25. Situação do domicílio: 1. Próprio. 2. Cedido. 3. Alugado. 4. Em ocupação 5. Sublocado. 6. Na rua 7. Outro _____	V.25
26. Número de moradores	V.26
27. Número de cômodos	V.27
28. Relação do entrevistado com a pessoa responsável pela família 1. Pessoa responsável 2. Cônjuge, Companheiro(a) 3. Filho(a), Enteado(a) 4. Pai, Mãe, Sogro(a) 5. Neto(a), Bisneto(a) 6. Irmão, Irmã 7. Outro parente 8. Agregado(a) 9. Pensionista 10. Empregado(a) doméstico(a) 11. Parente do Empregado(a) doméstico(a) 12. Individual em domicílio coletivo	V.28
29. Qual a sua ocupação? (99 é o código para informação não obtida)	V.29
30. Rendimento Econômico Mensal (Pessoal): \$ _____	V.30
31. Realiza outra atividade remunerada? 1. Sim 2. não Não Qual _____	V.31
32. Renda familiar atual (renda total de todos os moradores e de outras fontes)? \$ _____	V.32

V. HÁBITOS DE VIDA**Tabagismo**

33. Você fuma? (se a resposta for "sim", realiza até a questão "40" e passe para a 46, se a resposta for "não" passe para questão "41") 1. Sim 2. Não 8. Não deseja responder	V.33
34. Há quanto tempo fuma? 1. Menos de 6 meses . 2. Mais de 6 meses 9. Não se aplica	V.34
35. Quanto tempo após acordar você fuma seu primeiro cigarro? 1. Dentro de 5 minutos 2. Entre 6 e 30 minutos 3. Entre 31 e 60 minutos 4. Após 60 minutos 9. Não se aplica	V.35
36. Você acha difícil não fumar em lugares proibidos como igrejas, bibliotecas, etc? 1 Sim 2. Não 9. Não se aplica	V.36
37. Qual o cigarro do dia que traz mais satisfação? 1. O primeiro da manhã 2. Outros 9. Não se aplica	V.37
38. Quantos cigarros você fuma por dia? 1. Menos de 10 2. De 11 a 20 3. De 21 a 30 4. Mais de 31 9. Não se aplica	V.38
39. Você fuma mais frequentemente pela manhã?	V.39

1. Sim 2. Não 9. Não se aplica	
40. Você fuma, mesmo doente, quando precisa ficar de cama a maior parte do tempo? 1. Sim 2. Não 9. Não se aplica	V.40
41. Você fumou alguma vez na vida? (se a resposta for "não" passe para questão "44") 1. Sim 2. Não 9. Não se aplica	V.41
42. Quantos cigarros você já fumou na vida? 1. Menos de 100 cigarros 2. Mais de 100 cigarros 9. Não se aplica	V.42
43. Há quanto tempo você parou de fumar? 1. Menos de 6 meses 2. Mais de 6 meses 9. Não se aplica	V.43
44. Você convive com alguma pessoa que fuma? (se a resposta for "não" passe para a questão "46") 1. Sim 2. Não 9. Não se aplica	V.44
45. Onde você tem contato com essa pessoa? 1. Casa 2. Escola 3. Trabalho 4. Outro _____ 9. Não se aplica	V.45

Consumo de álcool

46. Você costuma beber bebida alcoólica? (se a resposta for "não" passe para a questão "53") 1. Sim 2. Não 8. Não deseja responder	V.46
47. Com que frequência você bebe? 1. Uma vez por mês 2. Somente fins de semana 3. Mais do que nos fins de semana 4. Todos os dias 5. Alcoólico Anônimo 8. Não deseja responder 9. Não se aplica	V.47
48. Há quanto tempo bebe? _____ 1. Semanas 2. Meses 3. Anos 7. Não sabe responder 8. Não deseja responder 9. Não se aplica	V.48
49. Tem sentido a necessidade de diminuir ou deixar de tomar bebidas alcoólicas? 1. Sim. 2. Não. 7. Não sabe responder 8. Não deseja responder 9. Não se aplica	V.49
50. Existem pessoas que lhe tem criticado pela forma de como você bebe? 1. Sim 2. Não 7. Não sabe responder 8. Não deseja responder 9. Não se aplica	V.50
51. Você se sente culpado pela forma como você bebe? 1. Sim. 2. Não. 7. Não sabe responder 8. Não deseja responder 9. Não se aplica	V.51
52. Tem precisado tomar um gole de bebida alcoólica nas primeiras horas da manhã para acalmar seus nervos ou a ressaca do dia anterior? 1. Sim 2. Não 7. Não sabe responder 8. Não deseja responder 9. Não se aplica	V.52

Drogas.

53. Você utiliza drogas?(se a resposta for não, passe para questão 57) 1. Sim 2. Não. 8. Não deseja responder	V.53
54. Qual o tipo? 1. Maconha 2. Crack 3. Cocaína 4. Heroína 5. Outro _____ 8. Não deseja responder 9. Não se aplica	V.54

55. Qual a via de uso? 1. inalantes 2. injetáveis 3. orais 8. Não deseja responder 9. Não se aplica	V.55
56. Há quanto tempo utiliza drogas? _____ 1. Semanas 2. Meses 3. Anos 7. Não sabe informar 8. Não deseja responder 9. Não se aplica	V.56

VI. HISTORIA DE CONTATO.

57. Você teve contato com alguém com tuberculose? (se a resposta for "não" passe para a questão "63"). 1. Sim 2. Não 7. Não sabe informar 8. Não deseja responder	V.57
58. Com quantas pessoas?	V.58
59. Quando esta pessoa esteve doente? 1. Agora está doente 2. Há menos de um ano 3. Há um ano ou mais 4. Há mais de cinco anos 7. Não sabe informar 9. Não se aplica	V.59
60. Qual o seu grau de contato com essa pessoa com tuberculose? (se a resposta não for "mesmo domicílio" passe para a questão "62"). 1. Mesmo domicílio 2. Vizinho 3. Colega de trabalho/ escola 4. Outro 8. Não deseja responder 9. Não se aplica	V.60
61. A pessoa com tuberculose dormia no mesmo cômodo com você? 1. Sim 2. Não 9. Não se aplica	V.61
62. Por quanto tempo essa pessoa esteve em contato com você? Especificar. _____ 1. Semanas 2. Meses 3. Anos 7. Não sabe informar 9. Não se aplica	V.62

VII. HISTÓRIA CLÍNICA

63. Você já teve tuberculose antes? (se a resposta for "não", passe para questão "66") 1. Sim 2. Não	V.63
64. Há quanto tempo? _____ 1. Semanas 2. Meses 3. Anos 7. Não sabe informar 9. Não se aplica	V.64
65. Você já realizou tratamento para Tuberculose? 1. Sim 2. Não 9. Não se aplica	V.65
66. Início dos sintomas? _____ 1. Dias 2. Semanas 3. Meses 3. Anos 8. Não sabe informar 9. Não se aplica	V.66
67. Você tem apresentado febre? (se a resposta for "não" siga para a questão "69") 1.- Sim 2. Não	V.67
68. Tempo de febre? Especificar. _____ 1. Dias 2. Semanas 3. Meses 9. Não se aplica	V.68
69. Você tem apresentado tosse? (se a resposta for "não" passe para a questão "73") 1. Sim 2. Não	V.69
70. A tosse é com escarro? (se a resposta for "não" passe para a questão "72") 1. Sim 2. Não 9. Não se aplica	V.70
71. O escarro é com sangue? 1. Sim 2. Não 9. Não se aplica	V.71
72. Tempo de tosse? _____ 1. Dias 2. Semanas 3. Meses 4. Anos 9. Não se aplica	V.72

73. Tem aumento de gânglio? (se a resposta for "não" passe para a questão "75") 1. Sim 2. Não	V.73
74. Que parte do corpo refere aumento de gânglio? 1. Axilar 2. Inguinal 3. Pescoço 4. Outros 9. Não se aplica	V.74
75. Você sua além do normal à noite? 1. Sim 2. Não	V.75
76. . Você está perdendo peso? 1. Sim 2. Não	V.76
77. Você tem outro sintoma? 1. Sim 2. Não Se a resposta for positiva, especifique: _____	V.77
78- Você usou algum medicamento para tratar a doença atual antes de vir a esta unidade? (se a resposta for "não" passe para a questão "80") 1. Sim 2. Não	V.78
79. Qual o medicamento você usou? 1. Isoniazida 2. Rifampicina 3. Etambutol 4. Pirazinamida 5. Estreptomicina 6. Etionamida 7. Não sabe informar 8. Outro especifique) _____	V.79
80. Já fez teste de AIDS alguma vez? 1. Sim 2. Não 7. Não sabe informar 8. Não deseja responder	V.80

VIII. DADOS SOBRE O ATENDIMENTO

81. A pessoa por quem você foi atendido (a) é: (em relação ao primeiro atendimento) 1. Médico (a) 2. Enfermeiro(a). 3. Outro. Especificar	
82. Quando começou com esta doença, quais os serviços de saúde que procurou? numera por ordem de procura) 1º _____ 2º _____ 3º _____ 4º _____ 5º _____ —	
83. Esse serviço de saúde é o mesmo que procura na maioria das vezes que adoecer? (se a resposta for sim" passe para a questão "85") 1. Sim 2. Não	V.83
84. Qual o serviço de saúde que procura na maioria das vezes que adoecer?	V.84
85. Você recebeu visita da equipe de saúde na sua casa? (se a resposta for "não" passe para a questão "88") 1. sim 2. não	V.85
86. Que profissional o visitou? 1. médico 2. Enfermeira 3. Agente Comunitário de saúde 4. Outro 7. não sabe informar 9. Não se aplica	V.86
87. Especifique o programa a que o profissional pertence: 1. PSF 2. PACS 3. Nenhum 4. Outro 7. não sabe informar 9. Não se aplica	V.87

IX. EXAMES REALIZADOS

88. Baciloscopia Diagnóstica	V.89 1ª _____ / _____ / _____ () 1. Negativa () 2. Positiva _____ Cruzes 2ª _____ / _____ / _____ () 1. Negativa () 2. Positiva _____ Cruzes
89. Cultura: 1. Positiva 2. Negativa 3. Não realizada	V.89
90. Material da coleta? 1. Escarro 2. Outros _____	V.90
91. Realizou PPD? (Se a resposta for "não" passe para a questão "93") 1. Sim 2. Não 8. Não sabe informar	V.91
92. Resultado do PPD? 1. Positiva 2. Negativa 9. Não se aplica _____ mm	V.92
93. Verificar se a pessoa tem cicatriz vacinal da BCG. 1. Sim 2. Não	V.93
94. Quantas cicatrizes? 1. Uma 2. Duas 3. Nenhuma 4. Duvidoso	V.94
95. Radiografia: (se a resposta for "não realizou" passe para a questão "97") 1. Suspeita 2. Normal 3. Não realizou	V.95
96. Padrão radiológico? 01. Normal 02. Infiltrado local 03. Infiltrado difuso 04. Cavidade única 05. Cavidade múltipla 06. Miliar 07. Nodular 08. Adenomegalias 09. Derrame pleural 10. Outros 99. Não realizado	V.96
97. Sorologia para HIV : (ELISA /Imunofluorescência ou WESTERN BLOT) 1. Positiva 2. Negativa 3. Inconclusiva 4. Não realizada	V.97
98. Forma clínica da tuberculose: 1. Pulmonar 2. Extrapulmonar 3. Pulmonar + Extrapulmonar	V.98
99. Outros exames não especificados acima (Ex : PCR, Broncoscopia) 1. Positiva 2. Negativa 9. Não se aplica	V.99
100. Esquema de Tratamento: 1. I (tratamento inicial) 2. Outro _____	V.100
X.PERCEPÇÃO /CONHECIMENTO SOBRE A DOENÇA	
101. Cor da pele (referida pelo paciente) 1. Branca 2. Preta 3. Amarela 4. Parda 5. Indígena	V. 101
102. O entrevistado ou algum membro da família morou : 1. na rua? 2. em albergues? 3. na prisão? 9. N.S.A.	V.102
103. Como você acha que se transmite ("que se pega") tuberculose? 1. Exposição à tosse, espirros de pessoas infectadas. 2. Contato com utensílios para comer, dormir, roupas, toalhas, etc. 3. Contato com fezes ou urina de pessoas infectadas 4. Contato casual com pessoas infectadas 5. Contato sexual com pessoas infectadas 6. Outro (especificar): _____	V.103
104. Você tem preferência por lugares:	V.104

1. Pouco povoados 2. Muito povoados	
105. A tuberculose pode ser comparada com qual das doenças abaixo: 1. Pneumonia 2. Câncer 3. Resfriado comum 4. Diabetes 5. HIV/ Aids 6. Problemas cardíacos 7. Outra (especificar): _____	V.105
106. Você tem tido fome exagerada? 1. Sim 2. Não	V.106
107. Você tem bebido muita água? 1. Sim 2. Não	V.107
108. Você tem perdido peso mesmo comendo muito? 1. Sim 2. Não	V.108
109. Você tem machucados ou feridas que demoram em curar? 1. Sim 2. Não	V.109
110. Você tem tido fadigas ou dores nas pernas? 1. Sim 2. Não	V.110
111. Você tem diagnóstico de diabetes? 1. Sim 2. Não	V.111
112. Há quanto tempo foi diagnosticado? _____ 1. Dias 2. Semanas 3. Meses 4. Anos 9. Não se aplica	V.112
113. Você está recebendo medicamentos para diabetes? 1. Sim 2. Não	V.113
114. Quais medicamentos? 1. Comprimidos 2. Insulina 3. Os dois 4. Nenhum 9. Não se aplica	V.114
115. Se não recebe medicamento o que faz para se controlar? 1. Homeopatia 2. Dieta 3. nada 9. não se aplica	V.115
116. Você tem algum parente com diabetes? 1. Sim 2. Não	V.116
117. Glicemia com jejum? _____ mg/dl	V.117
118. Glicemia sem jejum? _____ mg/dl	V.118
119. Colocar o peso do entrevistado _____ Kg	V.119
120. Colocar a altura do entrevistado? _____ metros	V.120

<p>121. O entrevistado (ou a família – que more no mesmo domicílio) possui:</p> <ol style="list-style-type: none">1. Rádio (quantos? _____)2. Televisão (quantas? _____)3. Fogão (quantos? _____)4. Geladeira (quantas? _____)5. Telefone fixo (quantos? _____)6. Telefone celular (quantos? _____)7. Máquina de lavar roupa (quantas? _____)8. Forno de microondas (quantos? _____)9. DVD (quantos? _____)10. Filmadora de vídeo (quantas? _____)11. Computador (quantos? _____)12. Carro (quantos? _____)	<p>V.121</p>
--	---------------------

Anexo 2: Protocolo RFLP IS6110

2.1 Extração do DNA cromossomal

Os isolados de *M. tuberculosis* que apresentaram crescimento visível no cultivo em meio *Löwestein-Jensen* (LJ), foram submetidos à extração do DNA, na qual duas alçadas cheias da massa bacteriana foram transferidas para tubo de microcentrífuga com 500 µL de tampão TE 1X [10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8,0] e em seguida incubado em banho-maria a 80°C por 30 minutos para inativação de todas as células.

A lise bacteriana foi realizada através da adição de 70 µL de lisozima (10 mg/mL) estocada a -20°C e incubação por 18-24 horas a 37°C. Após este período, adicionou-se 90 µL de solução de SDS 10%/ Proteinase K (10 mg/mL) e incubou-se em banho-maria a 65°C por 15 minutos.

Em seguida, foram acrescentados 100 µL de NaCl 5M e 100 µL de CTAB pré-aquecido a 65°C para a complexação de proteínas e lipídeos. Então, a mistura foi agitada novamente e incubada em banho-maria a 65°C por 15 minutos. Nesta etapa a mistura assumiu aspecto leitoso, onde foram pipetados 700 µL da solução de clorofórmio/ álcool isoamílico (24:1) seguidos de homogeneização e centrifugação por 10 minutos a 12.000 rotações por minuto (RPM).

Após a centrifugação, 500 µL da fase aquosa foi transferida para um novo microtubo esterilizado e adicionou-se 10 µL de RNase, com posterior incubação a 37°C por 1 hora. Em seguida, foram acrescentados 450 µL de isopropanol para precipitação dos ácidos nucleicos, a mistura foi homogeneizada por inversão e incubada por 18-24 horas a -20°C. Em seguida, centrifugou-se por 30 minutos a 12.000 RPM, removeu-se o sobrenadante por inversão e lavou-se o sedimento com 500 µL de etanol 70% previamente resfriado a -20°C, para lavagem do DNA precipitado. Centrifugou-se novamente por 30 minutos a 12.000 RPM para remover o etanol, sobrenadante foi desprezado e o *pellet* secou a temperatura ambiente.

Após estar completamente seco o precipitado será ressuspenso em 50 μL de tampão TE 1X. O DNA extraído foi mantido a 4°C antes da quantificação por 48 horas.

2.2 Quantificação e digestão

Para determinar a concentração de DNA, 2 μL das preparações purificadas como descrito no anexo 2.1, foram diluídos em 198 μL de água destilada estéril e submetidos à leitura da absorbância em espectrofotômetro específico (GeneQuant II, Pharmacia Biothec). Aproximadamente 5 μg de DNA de cada preparação foi transferido para microtubos estéreis e adicionou-se : 5 unidades (U) da enzima de restrição Pvu II, 2 μL da solução tampão específica da enzima e um volume de água purificada estéril para completar o volume final de 20 μL . Os tubos foram incubados em banho - maria a 37°C por quatro horas.

2.3 Eletroforese e transferência para a membrana

Após a incubação foram acrescentados em cada tubo, 4 μL de solução de arraste (azul de bromofenol) e aplicados nos orifícios do gel de agarose (20X20 cm) a 1% em solução tampão TAE [Tris-Base, ácido acético glacial, EDTA 2.H₂O] diluída 10 vezes. Em cada gel, foi incluído o DNA da cepa de referência *M.tuberculosis* 14323 na 10ª posição e ambas laterais. A separação por eletroforese foi realizada a 30 V, durante 20 horas em temperatura ambiente.

Os procedimentos para despurinação, desnaturação, neutralização e transferência dos fragmentos de DNA separados no gel de agarose para a membrana de náilon foram realizados, utilizando-se o equipamento VacuGene XL Vacuum Blotting System (Pharmacia Biothec), conforme instruções do fabricante. Cada gel foi colocado sobre uma membrana de náilon positivamente carregada, previamente tratada com água e solução salina 20 vezes supersaturada [NaCl 3M, Na-citrato 0,3M - pH 7,0]. O sistema foi estabilizado em pressão de 50 mbar, enquanto o gel sofreu despurinação com HCl 0,25 M,

por 7 min. Depois foi desnaturado com NaCl 1,5 M e NaOH 0,5 M por 7 min e neutralizado com Tris 1,0 M e NaCl 1,5 M (pH 8,0), por mais 7 min. A transferência foi realizada com solução salina 20 vezes supersaturada [NaCl 3M, Na-citrato 0,3M - pH 7,0] durante 30 min.

Para a fixação dos fragmentos de DNA, as membranas foram expostas a 120.000 μ joules de radiação ultravioleta (Stratalinker UV crosslinker, modelo 1800, Stratagene, La Jolla, CA, EUA) por aproximadamente 20 segundos.

2.4 Preparo da sonda genética

2.4.1 Amplificação do DNA

O DNA utilizado como sonda consiste em uma seqüência de 245 pb do elemento de inserção *IS6110* e foi preparado pela reação em cadeia da polimerase (PCR) com a utilização de oligonucleotídeos iniciadores, descrito por van Embden *et al* (1993).

- INS1 (5' CGT GAG GGC ATC GAG GTG GC)
- INS2' (5' GCG TAG GCG TCG GTG ACA AA)

Procedeu-se a extração de DNA da cepa padrão ATCC de *M. tuberculosis* que contenha o gene *IS6110*, conforme protocolo descrito no anexo 2.1.

Em seguida, realizou-se de 10 reações de PCR utilizando os primers INS1 e INS2 e os reagentes: solução tampão 10 X (Tris-HCl 10 mM – pH 8.3, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM), MgCl₂ 1 mM, 0,2 mM de cada desoxirribonucleotídeo trifosfatado (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 25 pmoles de cada oligonucleotídeo iniciador (INS1 e INS2), 25 pmoles dos primers Ris1 e Ris 2, 1,0 U de Taq DNA-polimerase e água ultrapura estéril para completar o volume de 45 μ L.

Os 50 μ L de cada reação foram misturados em microtubo esterilizado. Adicionou-se 50 μ L de acetato de sódio 3M, 1,1 mL de etanol 100% resfriado a

-20°C e misturou-se por inversão. A solução foi mantida a -20°C por 18-24 horas.

Centrifugou-se a 12.000 RPM por 30 minutos a 4°C e após este período o sobrenadante foi desprezado, o pellet lavado uma vez com etanol 70% resfriado e submetido à outra centrifugação.

Após secagem em temperatura ambiente, o sedimento foi ressuscitado em 500 µL de tampão TE [10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8,0] e a sonda foi estocada a -20°C até o momento do uso.

2.4.2 Purificação e marcação da sonda de DNA

Para a marcação com digoxigenina (DIG) 11-dUTP (Genius DNA Labelling and Detection Kit, Boehringer Mannheim), aproximadamente 1 µg da sonda de DNA, com a concentração determinada conforme anexo 1.2, foi desnaturado pela fervura por 10 minutos e submetido a um resfriamento rápido em banho de gelo com cloreto de sódio.

Em seguida foram adicionados os seguintes reagentes: 2 µl da mistura de hexanucleotídeo, 2 µl da mistura de desoxirribonucleotídeo, 1 µl do reagente contendo o fragmento Klenow da DNA Polimerase I (Genius DNA Labelling and Detection Kit, Boehringer Mannheim) e água ultrapura esterilizada para completar o volume para 20 µl.

Após incubação do tubo em banho-maria a 37°C por 18hs, o DNA -sonda foi precipitada com 2,5 µl de cloreto de lítio 4M e 75 µl de etanol 100% refrigerado e após homogeneização, a mistura foi mantida a -20°C por 18 h. O sedimento obtido pela centrifugação a 12.000 RPM por 30 minutos, foi lavado com etanol 70% refrigerado, mantido a temperatura ambiente para secagem, suspenso em 50 µl de solução tampão Tris-EDTA mais docecil sulfato de sódio e armazenado a -20°C.

2.4.3 Quantificação da sonda de DNA marcada

Para a determinação da concentração da sonda de DNA marcado, as preparações obtidas como descrito no anexo 2.4.2 foram diluídas em séries

(razão 10) em solução tampão específica (Genius DNA Labelling and Detection Kit, Boehringer Mannheim) e 1 µl de cada diluição foi aplicado em uma membrana de náilon positivamente carregada. Após a fixação do DNA como descrito no anexo 1.3, a membrana foi colocada em uma placa de petri umedecida com tampão 1 [NaCl 150 mM, Ácido Maléico 100 mM pH 7.5] e imersa em 10 ml da solução tampão 2 [NaCl 150 mM, Ácido Maléico 100 mM pH 7.5, solução bloqueadora 10%] por 5 minutos.

O anticorpo contra DIG (DIG DNA Labelling and Detection Kit, Boehringer Mannheim) conjugado a fosfatase alcalina, diluído 1: 5.000 em tampão 2 foi adicionado e depois de 5 minutos, retirado com a realização de duas lavagens consecutivas da membrana com tampão 1 por 5 minutos. O tampão 3 [Tris-base 100 mM, NaCl 100 mM pH 9.5] foi adicionado e retirado após dois minutos. A revelação da reação antígeno-anticorpo foi realizada pela adição de 10 ml da solução de revelação [Tris-base 100 mM, NaCl 100 mM pH 9.5, Nitrobluetetrazolium e X-fosfatase].

A membrana foi mantida ao abrigo da luz e examinada periodicamente quanto ao aparecimento de cor. Após secagem da membrana, estimou-se a concentração de DNA seguindo a escala de cores fornecida pelo fabricante.

2.5 Hibridação do DNA bacteriano com a sonda de DNA marcada

As membranas contendo os fragmentos de DNA preparadas como descrito no anexo 1.3, foram acondicionadas em cilindros de vidro, com a face contendo DNA voltada para cima. Depois de umedecidas com a solução salina 2 vezes supersaturada [NaCl 0,3 M, Na-citrato 0,03M - pH 7,0] as membranas foram incubadas com 10 mL da solução de hibridação [formamida, solução 20X SSC, solução bloqueadora 10%, n-Lauroiosarcosina 10% e SDS 10%] a 42°C por 2 hora em forno de hibridação. Após retirar a solução, foram acrescentados 10 mL de solução de hibridação contendo aproximadamente 15 ng de sonda de DNA marcada previamente, desnaturada (100°C por dez minutos e resfriamento em banho de gelo por cinco minutos). Após hibridação a 42°C por um período de 18-20 h, as membranas foram lavadas quatro vezes.

As duas primeiras lavagens foram realizadas com 50 mL de solução 2X SSC - 0,1% SDS a temperatura ambiente por 5 minutos e as duas lavagens com 50 mL de solução 0.5 X SSC - 0,1% SDS a 68°C por 15 minutos. Após o tratamento com 50 mL da solução tampão 1 [NaCl 150 mM, Ácido Maléico 100 mM pH 7.5] por 5 minutos, as membranas serão mantidas em 90 mL da solução tampão 2 [NaCl 150 mM, Ácido Maléico 100 mM pH 7.5, solução bloqueadora 10%] a temperatura ambiente por 30 minutos. Esta solução foi substituída por 10 mL da solução tampão 2 contendo 2 µl do anticorpo contra DIG conjugado a fosfatase alcalina.

Após incubação a temperatura ambiente por 30 minutos, as membranas foram submetidas a duas lavagens em 50 mL de solução tampão de lavagem [NaCl 150 mM, ácido maléico 100 mM pH 7.5 e Tween 20] a temperatura ambiente por 15 minutos, retiradas do tubo de vidro e colocadas em um recipiente de vidro contendo 20 mL de solução tampão 3 [Tris-base 100 mM, NaCl 100 mM pH 9.5] com cloreto de magnésio por 4-5 minutos.

A revelação da reação antígeno-anticorpo foi realizada pela adição de 10 mL da solução de revelação [Tris-base 100 mM, NaCl 100 mM pH 9.5, Nitrobluetetrazolium e X-fosfatase]. A membrana foi mantida ao abrigo da luz e examinada periodicamente quanto ao aparecimento de cor por 30-60 minutos

A reação foi interrompida pela lavagem com tampão TE [10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8,0] e após revelação colorimétrica, a membrana foi armazenada a 37°C ao abrigo da luz para secagem.

Anexo 3: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE SAÚDE COLETIVA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezado (a) Sr. (a)

Estamos lhe convidando para participar de uma pesquisa que possui como objetivos estudar a distribuição de casos de tuberculose e estudar as características relacionadas à ocorrência e transmissão da TB na população adulta da cidade do Salvador. Para alcançar tais objetivos, se fará uso de um formulário composto por perguntas fechadas, através de entrevista com os participantes, contendo perguntas relacionadas com a identificação pessoal do participante, presença ou ausência de sintomas, aspectos sócio econômicos e história de contato. Os exames realizados no Centro de Saúde onde o senhor (a) é acompanhado serão consultados e os resultados serão anotados. Informamos que as informações coletadas servirão unicamente aos fins da pesquisa e, os relatórios emitidos ou trabalhos que porventura venham a ser divulgados não conterão referência aos dados de identificação individuais. Esclarecemos que o Senhor (a) poderá recusar a participação nesta pesquisa, sem nenhuma implicação quanto ao seu acompanhamento nas Unidades de Saúde onde esta pesquisa está sendo realizada, sendo a sua participação livre e voluntária. Todas as informações obtidas são confidenciais, utilizando todos os princípios que regem a Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196/96. Esta pesquisa terá a orientação, acompanhamento e assistência dos Profs. Mauricio L. Barreto e Profª Susan Martins Pereira.

Se você tiver alguma dúvida em qualquer momento desta pesquisa deve ligar para o telefone (71) 32637445 e falar com os responsáveis por este trabalho.

TERMO DE CONSENTIMENTO

Declaro que estou suficientemente esclarecido sobre o que esta pesquisa deseja fazer e que consinto de forma voluntária a fazer parte da mesma.

Assinatura do sujeito da pesquisa ou representante legal



Impressão Dactiloscópica

Salvador, ____ de _____ de 2007.
